



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Anatomía Patológica

**Estudio de la expresión
inmunohistoquímica de PD-L1
en las células tumorales y en
las células inmunes asociadas
al tumor en el carcinoma de
células pequeñas de pulmón**

TESIS DOCTORAL

Eva Tejerina González

Madrid, 2017

Servicio de Anatomía Patológica.

Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda

Servicio de Anatomía Patológica-Laboratorio de Dianas Terapéuticas.

Hospital Universitario HM Sanchinarro



Codirectores:

Dra. Susana Hernández Prieto

Dr. Fernando López-Ríos Moreno

Dra. Paloma Martín Acosta

INDICE

AGRADECIMIENTOS	9
DEDICATORIA.....	11
ABREVIATURAS	13
INTRODUCCIÓN	15
I. CARCINOMA DE CÉLULAS PEQUEÑAS DE PULMÓN	17
1. Epidemiología	17
2. Factores etiológicos.....	17
3. Características anatomopatológicas del carcinoma de pulmón de células pequeñas	17
4. Origen.....	21
5. Alteraciones genéticas y moleculares	22
6. Clínica	23
7. Estadificación	24
8. Pronóstico	25
9. Tratamiento	25
II. INMUNOTERAPIA.....	26
1. Generalidades	26
III. EL RECEPTOR PD-1 Y SUS LIGANDOS.....	39
1. Caracterización y función biológica.....	39
2. PD-1 y PD-L1 en inmunoterapia	42
3. Utilidad clínica del testado PD-1/PD-L1	43
4. Evaluación inmunohistoquímica del status PD-1/PD-L1.....	45
5. Métodos alternativos de valoración del status PD-1/PD-L1	54
6. Patrones de expresión de PD-1/PD-L1 en las neoplasias.....	54
7. PD-L1 en el carcinoma de pulmón de células pequeñas.....	55
8. PD-1 y PD-L1 en el microambiente inmunológico de las neoplasias	56
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	61
MATERIALES Y MÉTODOS.....	65
II. Técnicas inmunohistoquímicas	69
III. Valoración manual de la expresión de PD-L1	70
1. En las células tumorales.....	70
2. En los TILs.....	71

IV. Valoración automática de la expresión inmunohistoquímica de CD8	74
V. Análisis estadístico	75
1. De las variables clínicas	75
2. De la expresión inmunohistoquímica de PD-L1	78
3. De los linfocitos T CD8+	83
4. Pruebas estadísticas	83
RESULTADOS	85
I. Variables clínicas	87
II. Estudio morfológico y valoración cuantitativa	88
2. Valoración de la expresión inmunohistoquímica de PD-L1	91
IV. Asociación de variables clínicas con la expresión inmunohistoquímica de PD-L1	99
1. En las células tumorales	99
2. En los infiltrados inflamatorios asociados al tumor (TILs)	103
V. Análisis de la tinción inmunohistoquímica de PD-L1 en “células aisladas” en el tumor y en los TILs	107
1. Análisis de la tinción de PD-L1 en “células aisladas” en el tumor	107
2. Análisis de la tinción de PD-L1 en “células aisladas” en los TILs	108
3. Asociación de la tinción de PD-L1 en “células aisladas” entre el tumor y los TILs	109
4. Asociación de variables clínicas con la expresión inmunohistoquímica de PD-L1 en “células aisladas”	110
VI. Estudio de grupos de expresión inmunohistoquímica combinada de PD-L1 en las células tumorales y en los TILs	110
1. Definición de los grupos	110
2. Asociación de los grupos de expresión combinada de PD-L1 con variables clínicas	110
3. Análisis de la supervivencia global y del intervalo libre de enfermedad según grupos de expresión combinada de PD-L1 en las células tumorales y en los TILs	115
VII. Análisis de la tinción inmunohistoquímica de PD-L1 en las células tumorales y en los TILs según los intervalos recogidos por IASLC para el clon SP142 (Ventana®)	119
1. Definición de las categorías	119
2. Análisis en las células tumorales	120
3. Análisis en los infiltrados inflamatorios asociados al tumor (TILs)	125

VIII. Asociación de variables clínicas con la expresión inmunohistoquímica de PD-L1 en el tumor y en los TILs según los intervalos recogidos por IASLC para el clon SP142 (Ventana®).....	130
1. En las células tumorales.....	130
2. En los infiltrados inflamatorios asociados al tumor (TILs)	134
DISCUSIÓN	139
CONCLUSIONES	157
BIBLIOGRAFÍA.....	163

AGRADECIMIENTOS

A mis co-directores de tesis, las Dras. Paloma Martín Acosta y Susana Hernández Prieto y el Dr. Fernando López-Ríos Moreno, por su generosidad a la hora de brindar los recursos para la elaboración de esta tesis y por su apoyo.

A todo el personal técnico, facultativo y administrativo del Servicio de Anatomía Patológica-Laboratorio de Dianas Terapéuticas del Hospital Universitario HM Sanchinarro, muy especialmente a la TEAP Beatriz Domonte, por su profesionalidad y eficiencia en la realización de las técnicas necesarias para llevar a cabo este estudio.

Al Dr. Javier de Castro, Jefe de la Unidad de Oncología Torácica del Grupo HM Hospitales y las Dras. Ana Collazo y Beatriz Jiménez, por su colaboración en la revisión de los datos clínicos y su generosidad para permitirnos presentarlos en este estudio.

A la Dra. Ana Royuela, responsable del análisis estadístico de este trabajo, por su eficacia, buen humor e infinita paciencia.

A la Dra. Carmen Bellas, Profesora Titular del Departamento de Anatomía Patológica de la Universidad Autónoma de Madrid, por su estímulo y apoyo constantes y por su amistad.

A mis compañeros del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda, en especial a la Dra. Laura Nájera, Dra. Isabel Salas y a la Jefe de Servicio Dra. Clara Salas, por su ayuda y comprensión durante la elaboración de esta tesis doctoral.

A Virginia Navas, Gestora del Departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, por su disponibilidad y diligencia para solventar todos los trámites.

A los patólogos (médicos adjuntos, jefes de Sección y jefes de Servicio) del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario La Paz de Madrid, por su dedicación durante mi etapa de formación como residente.

A mis padres, Miguel y Guillermina, por brindarme la oportunidad de materializar una vocación y enseñarme la importancia de la dedicación y del esfuerzo.

DEDICATORIA

A mis hijos, Eva y Miguel/Miguel y Eva,
que hacen que todos los esfuerzos tengan sentido.

ABREVIATURAS

AC: adenocarcinoma.

ALK: receptor de kinasas del linfoma anaplásico.

APC: células presentadoras de antígenos.

BTB: biopsia transbronquial.

CE: carcinoma de células escamosas.

CPCP: carcinoma de células pequeñas de pulmón.

CPNCP: carcinoma de pulmón no célula pequeña.

CTC: células tumorales circulantes.

EBUS: biopsias transbronquiales guiadas por ultrasonografía endobronquial.

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group.

EE: enfermedad extensa.

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico.

EL: enfermedad localizada.

FDA: US Food and Drug Administration.

H&E: hematoxilina-eosina.

IASLC: International Association for the Study of Lung Cancer.

IFN γ : Interferón gamma.

LDT: test desarrollado en laboratorio (*laboratory developed test*).

MAC1: terapia de conversión de la actividad adaptativa de los macrófagos (*macrophage-adaptive conversion therapy*).

MDSCs: células supresoras derivadas de la serie mieloide.

MHC: moléculas de histocompatibilidad.

MIC1: terapia de conversión de la actividad innata de los macrófagos (*macrophage-innate conversion therapy*).

NCC: National Comprehensive Cancer Network.

NSE: enolasa neuronal específica.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

ON: óxido nítrico.

TAA: antígenos asociados al tumor.

TAMs: macrófagos asociados al tumor.

TILs: infiltrados inflamatorios asociados al tumor.

TNF: factor de necrosis tumoral.

Tregs: células T reguladoras.

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular.

INTRODUCCIÓN

I. CARCINOMA DE CÉLULAS PEQUEÑAS DE PULMÓN

1. Epidemiología

El cáncer de pulmón es la neoplasia maligna más frecuente en la actualidad, con 1,2 millones de casos diagnosticados cada año según la incidencia estimada por la Organización Nacional de la Salud (OMS). La mayoría de las neoplasias malignas pulmonares son carcinomas; sólo un 1% corresponde a otros tipos de tumores. Los carcinomas de pulmón se dividen en dos grandes grupos:

- 1) El carcinoma de pulmón no célula pequeña (CPNCP, o NSCLC, del inglés *non-small cell lung carcinoma*), en el que se engloban los siguientes tipos histológicos: el carcinoma escamoso (CE), el adenocarcinoma (AC) y el carcinoma de células grandes/indiferenciado;
- 2) El carcinoma de células pequeñas (CPCP o SCLC, del inglés *small cell lung carcinoma*).

Los dos primeros tipos histológicos (el carcinoma escamoso y el adenocarcinoma) incluyen la mayor parte de los casos; el carcinoma de células pequeñas de pulmón supone un 13-15% del total (Ettinger 2004, Travis 2012).

2. Factores etiológicos

Al igual que en el resto de variantes, el consumo de tabaco es factor etiológico principal; la duración e intensidad del hábito tabáquico constituyen los factores de riesgo principales. Esta asociación es más intensa en el CE y en el CPCP (en dicho orden) que en el AC. La asociación del CPCP con el consumo de tabaco es prácticamente constante. No se han demostrado diferencias de riesgo de desarrollar un CPCP según el sexo o el grupo étnico; las posibles diferencias de incidencia vienen condicionadas por los diferentes patrones de consumo tabáquico.

3. Características anatomopatológicas del carcinoma de pulmón de células pequeñas

El CPCP es una neoplasia maligna englobada en la clasificación de la OMS en el subgrupo de tumores neuroendocrinos, que además incluye otras tres entidades: el carcinoide típico, el carcinoide atípico y el carcinoma neuroendocrino de células grandes de pulmón. Estos tumores se caracterizan por mostrar grados variables de diferenciación morfológica de tipo neuroendocrino reconocibles al microscopio óptico tras tinción con hematoxilina-eosina (H&E), como son el patrón trabecular y/o en nidos (patrón “organoide”), la formación de pseudorrosetas, la disposición de las células de la periferia de los grupos “en empalizada” y un patrón cromatínico nuclear característico granular, descrito clásicamente como “en sal y pimienta”. Además de los rasgos morfológicos comunes, los 4 tipos de tumores neuroendocrinos de pulmón comparten características inmunohistoquímicas, ultraestructurales y moleculares. Los marcadores inmunohistoquímicos

utilizados para demostrar diferenciación neuroendocrina y habitualmente expresados por este tipo de neoplasias son cromogranina, sinaptofisina y CD56. En el estudio con microscopía electrónica es posible evidencia la presencia de gránulos neuroendocrinos intracitoplasmáticos.

Histológicamente, los criterios diagnósticos de cada uno de las variantes de tumor neuroendocrino de pulmón, así como sus rasgos distintivos, están bien establecidos (Travis 2011, 2012):

-Carcinoide típico: tumor de patrón carcinoide con menos de 2 mitosis en 2 mm² (10 campos de gran aumento), de tamaño mayor o igual a 0,5 cm.

-Carcinoide atípico: tumor de patrón carcinoide con 2-10 mitosis en 2 mm² (10 campos de gran aumento) O necrosis (con frecuencia punctata).

-Carcinoma neuroendocrino de células grandes:

1. Morfología neuroendocrina: nidos organoides, disposición en empalizada, patrón trabecular, formación de pseudorosetas.

2. Alta actividad mitótica: 11 o más mitosis en 2 mm² (10 campos de gran aumento), con una media de 80 mitosis en 2 mm² (10 campos de gran aumento).

3. Necrosis: frecuente en áreas tumorales amplias.

4. Características citológicas propias de CPNCP: tamaño celular grande, baja relación núcleo-citoplasmática, cromatina vesicular, granular fina o gruesa y/o nucléolo frecuente. Algunos tumores se componen de células con cromatina granular fina, sin nucléolo, pero son clasificados como carcinoma neuroendocrino de células grandes por el tamaño tumora grande y la presencia de citoplasma abundante.

5. Positividad para uno o varios marcadores neuroendocrinos con tinción inmunohistoquímica (excluyendo enolasa neuronoespecífica) y/o identificación de gránulos neuroendocrinos en el examen con microscopía electrónica.

-Carcinoma de pulmón de células pequeñas: constituida por células neoplásicas de pequeño tamaño (generalmente inferior al diámetro de 3 linfocitos pequeños, no activados), con:

1. Escaso citoplasma.

2. Núcleo de cromatina finamente granular, con nucléolo pequeño o ausente.

3. Alta actividad mitótica: 11 o más mitosis en 2 mm² (10 campos de gran aumento), con una media de 80 mitosis en 2 mm² (10 campos de gran aumento).

4. Necrosis frecuente, especialmente en las áreas tumorales de tamaño grande.

La morfología del CPCP en el examen con microscopio óptico es muy característica y en ella se fundamenta el diagnóstico (figs. 1 y 2). Las células neoplásicas se disponen en nidos y trabéculas con empalizada periférica, formando rosetas o bien adoptando un patrón difuso. El citoplasma celular es escaso o inaparente y los límites celulares imprecisos. Las células, de tamaño habitualmente menor al de tres linfocitos pequeños, muestran núcleos redondeados, ovales o ligeramente fusiformes, de cromatina granular fina y nucléolo pequeño o ausente. Con frecuencia se observa en los grupos moldeamiento nuclear, así como fenómenos de arrastre cromatínico; éste último se observa en ocasiones en torno a los vasos sanguíneos, asociado a incrustación de ADN basófilo, dando lugar al denominado “fenómeno de Azzopardi”. El índice mitótico es elevado, con recuentos medios de unas 60 mitosis en 2 mm². Se identifican frecuentes imágenes de invasión linfovascular.

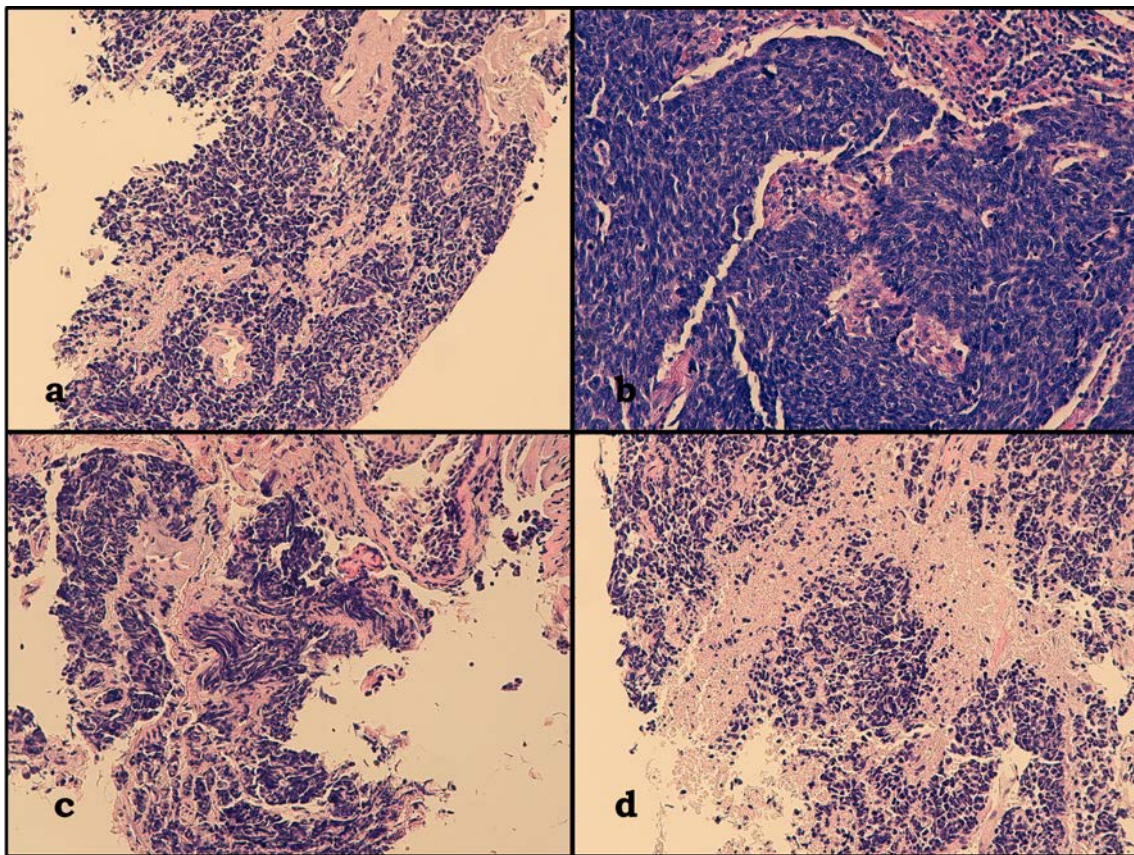


Fig.1. Características histológicas del CPCP: a) Células de pequeño tamaño; b) Núcleos de cromatina granular con alto índice mitótico; c) Fenómeno de “arrastre” cromatínico; d) Necrosis (H-E, 10x y 20x).

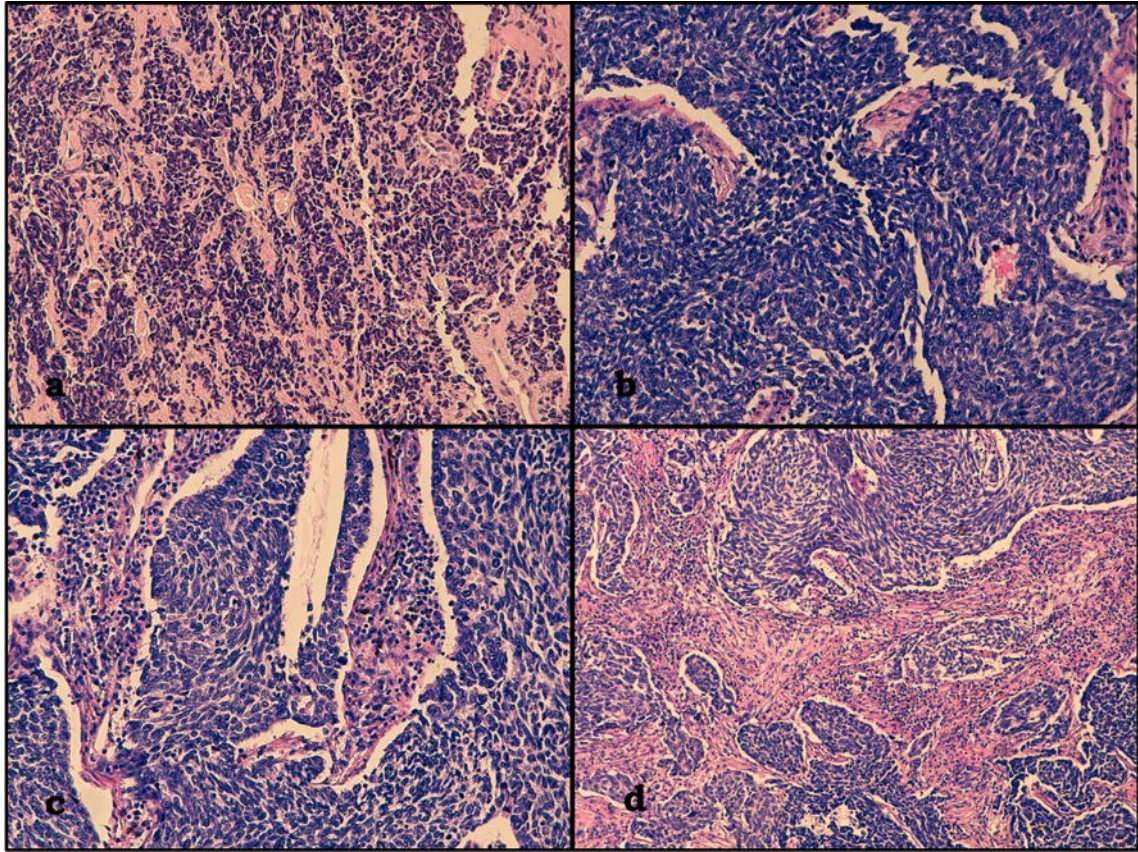


Fig.2. Patrones de crecimiento del CPCP: a) Difuso; b) Nidos coalescentes; c) Trabéculas con “empalizada” periférica; d) Invasión linfovascular (H-E, 10x y 20x).

En los tumores grandes pueden observarse células de mayor tamaño (incluyendo formas gigantocelulares), mayor grado de pleomorfismo nuclear y amplias áreas de necrosis. Este tipo de neoplasia, si bien es por sus características morfológicas de alto grado, no es susceptible de la gradación histológica habitualmente aplicada en los ACs y en los CEs de pulmón. Aunque como se ha descrito previamente el diagnóstico del CPCP se sustenta sobre hallazgos morfológicos, las técnicas inmunohistoquímicas y/o ultraestructurales pueden ser de ayuda a la hora de confirmar su naturaleza neuroendocrina (fig. 3). La mayoría de ellos son positivos para cromogranina, sinaptofisina y CD56; menos del 10% de tumores son negativos para los tres marcadores (Guinee 1994). Hasta en el 90% de los casos el CPCP es positivo para TTF-1 (Kaufmann 2000). La negatividad para p40 es útil para distinguirlo de la variante basaloide del CE. El estudio con microscopía electrónica demuestra gránulos neurosecretores de 100 nm en al menos 2/3 de los casos.

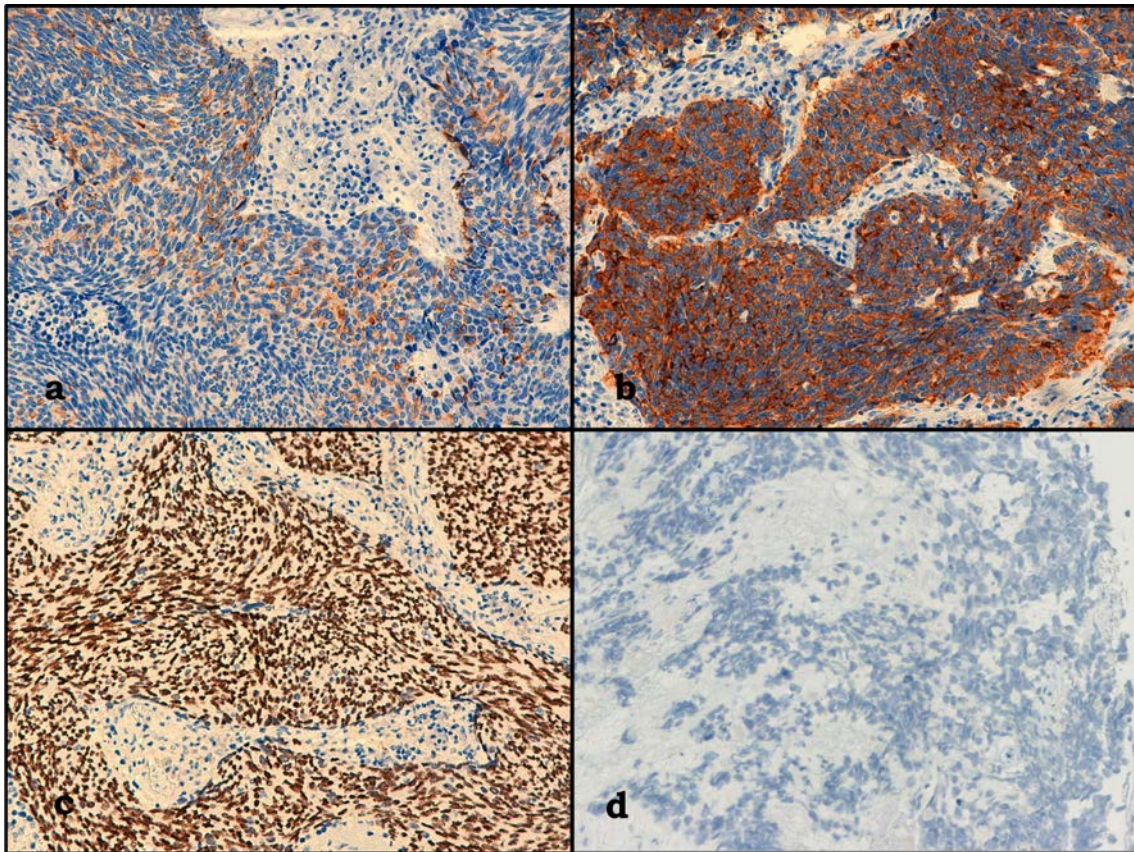


Fig. 3. Técnicas inmunohistoquímicas en el CPCP: a) Cromogranina; b) Sinaptofisina; c) TTF1; d) p40 (Tinción inmunohistoquímica, 20x).

Macroscópicamente son tumores de color pardo-blancuecino, con amplias áreas de necrosis, que se extienden a lo largo de la submucosa del bronquio de forma circunferencial.

El diagnóstico diferencial ha de realizarse con las denominadas neoplasias de células “pequeñas, redondas y azules” (linfoma, tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas, tumor neuroectodérmico primitivo, sarcoma de Ewing), con otros carcinomas primarios o metastásicos, con o sin diferenciación neuroendocrina, e incluso con infiltrados linfoides no neoplásicos de la mucosa bronquial. La correcta tipificación de este tipo de neoplasia requiere disponer de material suficiente, en buen estado de conservación; no es infrecuente en este sentido que, debido a la menor necesidad de procesamiento, las muestras citológicas permitan disponer de células mejor preservadas.

4. Origen

No se conoce con seguridad la célula de origen del CPCP. Se ha sugerido la existencia de una célula pluripotencial en el árbol bronquial con capacidad de diferenciarse a cada uno de los tipos histológicos de carcinoma pulmonar; no

obstante, y a diferencia de éstos, hasta la fecha no se ha reconocido una lesión preneoplásica propia del CPCP.

Los tumores neuroendocrinos forman parte de un espectro de proliferaciones epiteliales pulmonares que incluye desde hiperplasias y tumorlets hasta verdaderas neoplasias, así como tumores carentes de rasgos morfológicos propios de diferenciación neuroendocrina en los que dicha diferenciación es demostrada mediante técnicas inmunohistoquímicas:

1. Hiperplasia de células neuroendocrinas:

- Con fibrosis y/o inflamación asociada.
- Adyacente a un tumor carcinoide.
- Idiopática y difusa, con o sin fibrosis asociada de vías aéreas.

2. Tumores con diferenciación neuroendocrina:

- Carcinoide típico.
- Carcinoide atípico.
- Carcinoma neuroendocrino de células grandes.
- Carcinoma de células pequeñas.

3. Carcinoma no célula pequeña con diferenciación neuroendocrina.

4. Otros tumores con propiedades neuroendocrinas:

- Blastoma pulmonar.
- Tumor neuroectodérmico primitivo.
- Tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas.
- Carcinomas con fenotipo rabdoide.
- Paraganglioma.

5. Alteraciones genéticas y moleculares

Es un hecho conocido que el carcinoma de pulmón es el resultado de cambios genéticos y epigenéticos complejos que desencadenan la transformación maligna de las células mediante una progresión escalonada asociada a la acumulación de anomalías genéticas (Travis 2015). Dicha transformación tiene lugar mediante la adquisición por parte de algunas células de determinadas alteraciones en un pequeño número de genes que les confiere una ventaja proliferativa; este fenómeno, denominado iniciación, facilita la progresión a carcinoma invasivo de dicho clon celular. Los carcinógenos presentes en el humo del tabaco y en contaminantes industriales y/o ambientales pueden actuar como desencadenantes de dicho proceso de

iniciación en el tracto respiratorio. En los últimos años se ha evidenciado la existencia de alteraciones genéticas en todos los tipos histológicos principales de carcinoma de pulmón, que incluyen pérdidas de heterocigosidad, inestabilidad cromosómica, mutaciones en oncogenes y en genes supresores tumorales, cambios epigenéticos (hipermetilación de promotores) y expresión aberrante de genes involucrados en el control de la proliferación celular (Travis 2015). Aunque varias de ellas son compartidas por las distintas variantes, los estudios citogenéticos demuestran la existencia de un patrón característico de alteraciones cromosómicas en el CPCP:

- Mutaciones en TP53: constituyen la alteración genética más frecuente en los carcinomas de cualquier origen. Las mutaciones son habitualmente *missense* o sentido erróneo, y entre los distintos tipos de carcinoma de pulmón son más frecuentes en el CPCP, en el que aparecen en el 90% de los casos, que el CPNCP (George J 2015).

- Inactivación del gen del retinoblastoma (RB) y sobreexpresión de E2F1: producida principalmente como consecuencia de alteraciones genómicas complejas o mutaciones en uniones exón-intrón. Esta alteración está presente en aproximadamente el 65% de los casos de CPCP (Kaye 2002, George J 2015).

- Amplificación en genes de la familia MYC (*MYCL1*, *MYCN* y *MYC*) (Wistuba 2001, George 2015), *FGFR1* e *IRS2* (George 2015).

- Upregulation* o regulación al alza de la molécula proapoptótica Bcl-2.

- Activación de ciclos autocrinos.

- Metilación de caspasa-8.

- Alteración en el número de copias con elevada incidencia de deleciones de los cromosomas 3p, 5q, 10q, 13q y 17q asociada a ganancia de ADN en 3q, 5p, 6p, 8q, 17q, 19q y 20q (Balsara 2002). Las deleciones en el cromosoma 3p están presentes en cerca del 100% de los casos. Se localizan principalmente en las regiones 3p14.3-3p14.2 (locus del gen *FHIT5*) y 3p12.3-3p12.2 (locus del gen *ROBO1*) y con frecuencia se asocian a la formación de un isocromosoma 3q (George J 2015). La ganancia de ADN del cromosoma 17q24-q25 está considerada como un potencial marcador del desarrollo de metástasis cerebrales (Petersen 2000).

6. Clínica

El CPCP aparece frecuentemente diseminado al diagnóstico, con metástasis en ganglios regionales en un 26,1% de los casos y a distancia en el 52,8%. Únicamente un 8,2 % de los casos debutan como enfermedad localizada. En origen se trata de tumores de localización central, en forma de masa hilar o perihiliar en 74-78% de los casos, frecuentemente con adenopatías hiliares y colapso lobar asociado. Los tumores de localización periférica son radiológicamente indistinguibles de otras neoplasias pulmonares. La presencia

de cavitación y/o derrame asociado es menos frecuente que en otros tipos histológicos de carcinoma de pulmón. La sintomatología local del tumor primario es propia de neoplasias de localización central en el tracto respiratorio, e incluye estridor, hemoptisis, ronquera y parálisis de cuerda vocal entre otras, ésta última como resultado de la frecuente extensión locorregional precoz. No obstante, debido a su comportamiento agresivo, los síntomas más habituales son los propios de enfermedad diseminada: pérdida de peso, abdominalgia secundaria a metástasis hepáticas, pancreáticas o suprarrenales y dolor por afectación ósea. En estos casos no es infrecuente que el tumor primario no sea visible radiológicamente. Los pacientes desarrollan con frecuencia metástasis en el sistema nervioso central en el curso de su enfermedad, ya sea como múltiples focos de infiltración cerebroespinal o como siembra meníngea; hasta un 10% de ellos puede debutar con síntomas neurológicos por afectación cerebral en el momento del diagnóstico. Algunas de las manifestaciones neurológicas obedecen a un síndrome paraneoplásico y no a infiltración metastásica; esta circunstancia, que puede darse meses después de la detección del tumor o ser el primer signo de recidiva tras remisión, incluye cuadros de neuropatía sensorial y sensoriomotriz, neuropatías autoinmunes, encefalomielitis y síndrome miasténico de Lambert-Eaton. Los síndromes inmunológicos paraneoplásicos son frecuentes en el CPCP (Pedoeem 2014); algunos autores defienden que los autoanticuerpos generados por las células neoplásicas serían susceptibles de ser detectados en un ensayo clínico, tratando así de minimizar los efectos adversos del tratamiento (Schultheis 2015). Además, al tratarse de una neoplasia cuyas células muestran diferenciación neuroendocrina no son inhabituales los síndromes endocrinos, que incluyen síndrome de secreción inadecuada de hormona antidiurética, desenmascaramiento de una diabetes latente, y actividad de hormona adrenocorticotropa (ACTH) anormal. Aunque debido a la rápida evolución del tumor el desarrollo de un síndrome de Cushing es poco frecuente, hasta un 10% de los casos puede cursar con hiperpigmentación u otros síntomas de hipercortisolismo, o bien hipertrofia/hiperplasia de las glándulas suprarrenales secundaria a secreción ectópica de ACTH. La hipercalcemia es poco frecuente en el CPCP, incluso en casos con metástasis óseas, y es considerada prácticamente patognomónica de variante escamosa de carcinoma de pulmón. Un 10% de los pacientes debutan con síndrome de vena cava superior.

7. Estadificación

Debido a su frecuente diseminación al diagnóstico, la estadificación completa de los pacientes con CPCP incluye broncoscopia, radiografías de tórax, TAC torácico, ecografía o TAC de abdomen superior y evaluación ósea mediante gammagrafía o biopsia de médula ósea.

La alta frecuencia de enfermedad diseminada en el momento del diagnóstico en el CPCP ha llevado a la búsqueda de un sistema específico de estadificación (Shepherd 1993). En estos tumores, debido a su elevada tendencia a la diseminación precoz, la estadificación según el sistema TNM ha demostrado

tener un bajo potencial predictivo de supervivencia. Esta neoplasia se estadia en la actualidad en dos únicas categorías: enfermedad localizada o enfermedad extensa. Los criterios de consenso para ambas definidos por la IASLC (*International Association for the Study of Lung Cancer*) son los siguientes:

1) Localizada (EL): se considera equivalente a los estadios I al III del sistema TNM. Se define como enfermedad restringida a una región anatómica que puede ser tratada de forma segura con un campo de radiación tolerable (Ishii 2015); esto habitualmente corresponde a enfermedad en un hemitórax con metástasis en ganglios linfáticos regionales:

- Hiliar ipsilateral y contralateral.
- Mediastínico ipsilateral y contralateral.
- Supraclavicular ipsilateral y contralateral.
- Derrame pleural ipsilateral (independientemente del resultado del estudio citológico).

2) Extensa (EE): se considera equivalente al estadio IV de la clasificación TNM e incluye los casos con enfermedad más allá de los límites locorregionales previamente citados (Ishii 2015).

8. Pronóstico

El pronóstico del CPCP es en general infausto, con tasas de supervivencia que oscilan entre 23 meses en los pacientes con estadios limitados y 8 meses en pacientes con estadios extensos (Travis 2012). Hasta un 65% de los pacientes desarrolla diseminación metastásica extensa en el curso de su enfermedad, en uno o varios órganos. Las localizaciones más habituales son el pulmón contralateral (10%), los ganglios linfáticos (10%), la piel (10%), el cerebro (10%), la glándula suprarrenal (15%), la médula ósea (20%), el hígado (25%), los ganglios linfáticos retroperitoneales (5%) e incluso el páncreas (5%). Únicamente un pequeño número de casos en estadios iniciales es susceptible de tratamiento quirúrgico curativo. Se consideran factores de mal pronóstico el estadio avanzado (enfermedad extensa), los niveles elevados de lactato deshidrogenasa o de fosfatasa alcalina en suero, los niveles bajos de albúmina o de sodio en plasma y el mal estado general del paciente (Osterlind 1986). Hasta la fecha no se han encontrado criterios histológicos o genéticos que permitan predecir el curso de la enfermedad; el estadio continúa siendo el principal dato con valor pronóstico (Nicholson SA 2002).

9. Tratamiento

La terapia actual del CPCP continúa estando basada en la quimioterapia convencional y la radioterapia, habiéndose mantenido sin cambios en las últimas tres décadas (Metro 2012). El curso clínico habitual de la enfermedad es una respuesta inicialmente buena a la quimioterapia seguida de recidiva

pocos meses más tarde (Schultheis 2015, Ishii 2015); los pacientes acaban haciéndose refractarios al tratamiento quimioterápico (Ishii 2015).

El bloqueo de puntos de control del sistema inmunitario con anticuerpos monoclonales ha emergido recientemente como una nueva y prometedora herramienta terapéutica en oncología (Dong 2002, Pardoll 2012, Ishii 2015). Dado que el tratamiento quimioterápico actúa como estimulante de la actividad antitumoral del sistema inmune (Langer 2014), el periodo inmediatamente posterior a la finalización de los ciclos podría ser el más adecuado para la aplicación de terapias basadas en la inmunoterapia (Schultheis 2015). Estos procedimientos contribuirían a eliminar las células tumorales residuales, prolongando el periodo libre de enfermedad. Los resultados de la aplicación de estas terapias en ensayos clínicos son aún contradictorios: mientras que en algunos pacientes se observa una marcada regresión tumoral y una notoria mejoría en el curso de la enfermedad, en otros no se obtiene respuesta (Wolchok 2013, Topalian 2014, Brahmer 2010, Brahmer 2012, Topalian 2012, Taube 2014). Uno de los principales problemas a la hora de pautar tratamientos basados en la inmunoterapia lo constituyen las metástasis cerebrales; este tipo de metástasis, frecuente en los pacientes con CPCP, es habitualmente tratado con corticosteroides, que por su acción inmunosupresora podrían interferir con la terapia inmunológica.

Otro de los abordajes terapéuticos que está siendo evaluado en el CPCP es la inmunoterapia anti-PD-1/PD-L1; en la actualidad están en desarrollo dos ensayos clínicos, el primero con demcizumab (NCT01859741), un anticuerpo monoclonal dirigido contra el ligando Delta-like4 (DLL4) y el segundo con nivolumab, como monoterapia o en combinación con ipilimumab (NCT 01928394), un anticuerpo monoclonal frente a CTLA-4) (Yang 2014, Massarelli 2014).

II. INMUNOTERAPIA

1. Generalidades

El tratamiento del carcinoma de pulmón no metastásico se realiza habitualmente con intención curativa, mediante la utilización de cirugía, quimioterapia, radioterapia, o terapias frente a dianas terapéuticas específicas, solos o en combinación (Siegel 2015). No obstante, la mayoría de los pacientes se presenta con enfermedad diseminada y/o no resecable; por este motivo la terapia sistémica se ha convertido en un pilar esencial en el manejo del cáncer de pulmón (Travis 2013b). Sin embargo, se ha demostrado que los protocolos terapéuticos basados en la quimioterapia sistémica utilizados en la última década no han conseguido aumentar la supervivencia de los pacientes (Scagliotti 2008). En este contexto surge la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas. Dichas estrategias se han centrado en los últimos años en el desarrollo de terapias dirigidas frente a alteraciones moleculares específicas; en concreto, frente a eventos

mutacionales en determinadas vías de activación celular que hacen a las neoplasias susceptibles de ver frenado su crecimiento. Dado que estos eventos mutacionales se traducen en cambios en el ADN celular, ha sido posible desarrollar tests de detección de dichas anomalías de sensibilidad y especificidad adecuadas; dicha especificidad es además reproducible y mensurable (Borczuk 2015). De este descubrimiento derivó el paradigma de la unión entre una determinada terapia y un test diagnóstico predictivo de respuesta específico; éste último permitiría seleccionar aquellos pacientes con más probabilidad de verse beneficiados con dicha terapia.

La variante histológica de carcinoma de pulmón en la que se han llevado a cabo los mayores avances en el campo de la oncología personalizada es el AC. Así, las mutaciones en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*) son un dato predictivo de respuesta a los fármacos inhibidores de la actividad tirosín-kinasa dirigidos frente a la activación de este receptor (Siegelin 2014); las traslocaciones en el receptor de kinasas del linfoma anaplásico (*ALK*) desencadenan la activación de una ruta de señalización frente a la que pueden dirigirse diferentes inhibidores de la actividad tirosín-kinasa (Solomon 2014). La tasa de mutación de *EGFR* es aproximadamente del 20%, aunque varía dependiendo del hábito tabáquico y de la región geográfica. La tasa de mutaciones en el gen *ALK* oscila entre un 2% y un 5%. A la vista de los porcentajes citados es evidente que una proporción importante de casos de AC de pulmón y la mayoría de CE, carcinomas de célula grande y carcinomas sarcomatoides de pulmón no disponen en la actualidad de una diana terapéutica específica; en estos casos, los tratamientos convencionales pueden ser más eficaces en el control de la progresión tumoral que las terapias dirigidas (Cagle 2011). Este “vacío” ha supuesto un estímulo para el desarrollo de nuevas alternativas de tratamiento.

En los últimos años se ha ido acumulando de forma creciente la evidencia de que la activación del sistema inmune puede constituir una terapia eficaz en el tratamiento del cáncer. En lo que respecta a la actividad antitumoral del sistema inmune, los linfocitos T citotóxicos, dirigidos frente a las células tumorales, constituyen la subpoblación clave (Aerts 2013). El requisito imprescindible para que el sistema inmune desempeñe su acción antitumoral es pues que exista un número adecuado de linfocitos T citotóxicos funcionales; los agentes inmunomoduladores serían los encargados de incrementar la potencia y eficacia de su acción.

El uso de sistema inmune en las terapias frente al cáncer es una idea planteada desde hace varias décadas. Inicialmente, y en virtud de la pobre respuesta a tratamientos específicos como el bacilo de Calmette-Guerin, alfa-interferón y anticuerpos específicos como trastuzumab se consideró que el carcinoma de pulmón era una neoplasia poco inmunogénica, y por tanto poco susceptible de ser tratado con inmunoterapia (Matthay 1986, Jansen 1992, Schiller 1995, Clamon 2005, Domingues 2014, Borczuk 2015). En los últimos años las investigaciones se han centrado en la teoría de que las células tumorales son capaces, en algún momento de su crecimiento y proliferación,

de generar sistemas de “escape” del sistema inmunológico que les permitan sobrevivir; uno de los mecanismos postulados es la creación de un “microambiente” de inmunosupresión local y sistémico que afecta a la función de los linfocitos T citotóxicos (Aerts 2013). La capacidad de las células tumorales y de las del estroma circundante en el cáncer de pulmón para generar un microambiente capaz de suprimir la respuesta inmune del huésped contribuyendo a la progresión tumoral es un hecho bien conocido; esta actividad supresora se realiza fundamentalmente mediante una disminución en el número y función de los linfocitos T citotóxicos, y se ve reforzada por el efecto inhibitorio que la exposición al tabaco ejerce sobre el sistema inmunitario (Cornelissen 2012, Thomas 2012).

En la actualidad se conocen varios puntos clave en el sistema inmune responsables de bloquear la actividad de los linfocitos T. Algunas de estas moléculas inhibitorias son CTLA-4, el gen de activación linfocitaria 3 (LAG-3), la mucina 3 de la inmunoglobulina de células T (TIM-3) y PD-1, que mediante la unión a su ligando llevan al “agotamiento” funcional de los linfocitos T; éstos pierden de forma secuencial la capacidad de proliferar, de segregar citoquinas como IL-2 y de llevar a cabo los procesos de lisis tumoral (Aerts 2013). A este bloqueo de la respuesta de los linfocitos T frente a las células tumorales se añade la presencia de factores producidos por el tumor y/o de determinadas condiciones del microambiente tumoral que van a inducir la atracción de células con acción inmunosupresora, como las células T reguladoras (Tregs) y las células supresoras derivadas de la serie mieloide (MDSCs) (Aerts 2013).

1.1 Mecanismos de “escape” de las células tumorales del sistema inmune

Tanto las células tumorales como el estroma peritumoral utilizan al menos dos mecanismos para evitar su destrucción por las células citotóxicas: 1) La regulación a la baja de la expresión de determinados antígenos de membrana (moléculas de histocompatibilidad [MHC] clase I y antígenos asociados a tumor [TAA]), lo que reduce su acción estimuladora sobre los linfocitos T y su condición de “diana” para las células presentadoras de antígeno (APC) y b) disminuyendo o bloqueando la activación de los linfocitos T, ya sea mediante la inhibición de su función o induciendo su apoptosis (Aerts 2013). Por otra parte, las células tumorales adquieren anomalías genéticas y epigenéticas capaces de modificar la respuesta inmune antitumoral (Ogino 2011). Estos cambios en las características de las células neoplásicas y de su entorno, que tienen un efecto sumatorio y cuya repercusión clínica aún no es bien conocida, hacen necesaria una constante readaptación del sistema inmunitario frente al tumor (Aerts 2013).

En relación a los mecanismos de evitación tumoral existen varios componentes esenciales en la interacción tumor/sistema inmunitario (fig. 4):

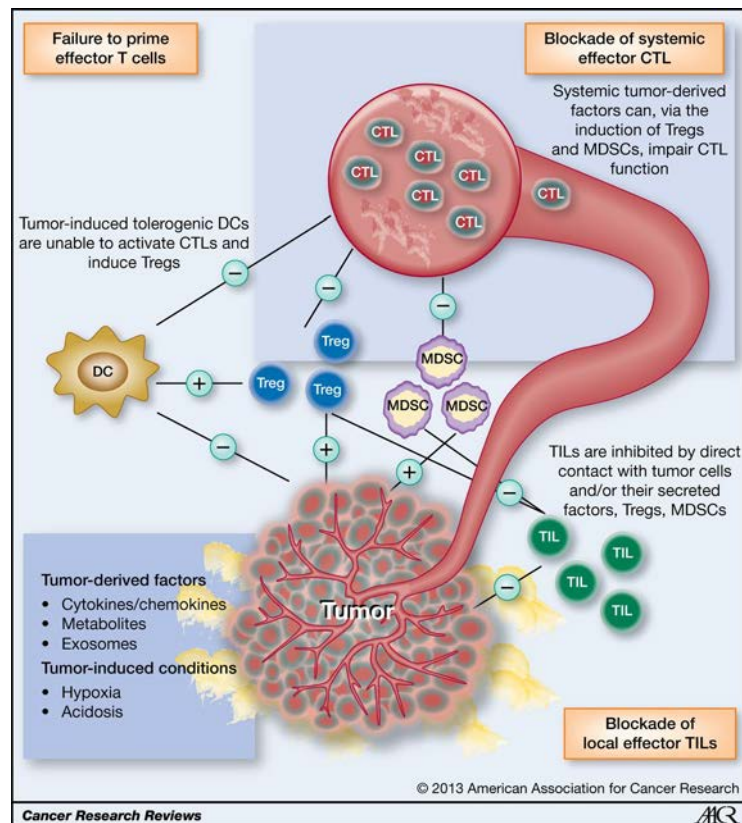


Fig. 4. Mecanismos de “escape” del tumor del sistema inmune (De: Aerts JG et al. Cancer Res 2013).

a) Las células presentadoras de antígeno (APC)

De entre los distintos tipos celulares con actividad presentadora de antígeno, las más importantes son las células dendríticas. Estas células desempeñan en el huésped un papel crucial de inmunovigilancia, siendo las encargadas de iniciar la respuesta antitumoral primaria mediada por los linfocitos T efectores. Su acción es también esencial en la activación del sistema inmune modificado o adaptado tras la aparición de una neoplasia, por su capacidad de incorporar antígenos tumorales y procesarlos y presentarlos a los linfocitos *naïve* para su activación antígeno-específica (es decir, dependiente de antígenos específicos del tumor) (Aerts 2013).

Aunque el número de células dendríticas identificadas en el interior de los nidos tumorales en las biopsias es escaso, su implicación y relevancia en la respuesta inmune antitumoral ha podido demostrarse en algunos estudios: 1) su identificación en el tejido tumoral en las neoplasias se correlaciona con un mejor pronóstico (Ananiev 2011, Guluvoba 2012, Kashimura 2012); y 2) en un estudio piloto llevado a cabo en pacientes con cáncer de pulmón se demostró que existe una correlación entre el porcentaje de células dendríticas inmaduras y el fenotipo de los linfocitos T citotóxicos en sangre (Krawczyk 2006).

b) El microambiente tumoral

Las células tumorales producen, tanto en los tejidos de origen como en los órganos en los que metastatizan, una amplia variedad de citoquinas, factores quimiotácticos y metabolitos con capacidad de interferir en el desarrollo y la funcionalidad de las células dendríticas locales y/o circulantes. Además, generan en los tejidos determinadas condiciones como la hipoxia que son capaces de inducir la adquisición por parte de los macrófagos de un fenotipo proangiogénico (M2), que a su vez conlleva la producción de factores con capacidad de inducir la neoformación de vasos sanguíneos, como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y la metaloproteinasa MMP-9 (White 2003). VEGF es también capaz, junto a factores tumorales como la interleuquina 10 (IL-10), de producir una disminución en el número y en la función de las células dendríticas; así, se ha demostrado que las expuestas a los factores citados muestran: 1) una disminución significativa en los niveles de expresión de moléculas de histocompatibilidad, de moléculas de adhesión celular y de moléculas co-estimuladoras; 2) un empeoramiento de la capacidad de absorción o integración de antígenos; 3) una disminución de la motilidad y 4) un deterioro en la capacidad de activación de las células T *naïve* (Dong 2003, Yanagimoto 2005, Brimnes 2006, Pizón-Charry 2007, Zeng 2007, Yang 2008, Jia 2012). En el carcinoma de pulmón no célula pequeña se ha descrito además la presencia de determinados factores, especialmente la linfopoyetina tímica estromal y COX-2, que incrementarían el número de células T reguladoras o Tregs, con acción promotora del crecimiento tumoral (Sharma 2005, Li 2011).

Los factores tumorales pueden así mismo afectar a los linfocitos T, influyendo negativamente sobre su supervivencia, activación y secreción de citoquinas. Así, ciertas proteínas ligadoras de glicanos pertenecientes a la familia de las galectinas son capaces de unirse a glucoconjugados presentes en las células T y desencadenar señales intracelulares que: 1) inducen la apoptosis celular; 2) suprimen la secreción de T_H1 y de citoquinas proinflamatorias; 3) bloquean el receptor de las células T (TCR) y 4) sensibilizan a los linfocitos T frente al factor inductor de muerte celular FasL. Otros factores como la interleuquina 10 (IL-10), el factor de crecimiento tumoral beta ($TGF-\beta$) y la prostaglandina E2 (PGE2) son capaces de inhibir de forma directa la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos T (Aerts 2013).

c) Las células T reguladoras (Tregs)

Las células T reguladoras o Tregs son una subpoblación de linfocitos T CD4+, CD25+ con acción inhibidora sobre el sistema inmunitario. Desempeñan un papel crucial en el mantenimiento de la quiescencia inmune, evitando la aparición de reacciones excesivas o desproporcionadas; es un hecho conocido que las anomalías en la función de las células T reguladoras contribuyen al desarrollo de enfermedades autoinmunes severas como la artritis reumatoide (Aerts 2013). Estas células, que constituyen entre el 2% y el 5% del total de linfocitos T CD4+ circulantes en sangre periférica, se caracterizan por la

expresión de Foxp3, GITR (proteína relacionada con el receptor del factor de necrosis tumoral [TNF] inducido por corticoides), LAG-3 (gen 3 de activación de linfocitos) y CTLA4, y por presentar regulación a la baja de interleukina 7 (IL-7 o CD127).

Los Tregs pueden derivar de la maduración de células linfoides en el timo (siendo entonces denominados Tregs naturales) o bien de la inducción de éstas en los tejidos o en la circulación sanguínea (Tregs inducidos). Los Tregs inducidos proceden de linfocitos T *naïve* activados tras estimulación antigénica subóptima por parte de células dendríticas inductoras de tolerancia inmunológica o tras estimulación con factor de crecimiento tumoral beta (TGF- β) e interleukina 10 (IL-10). Los Tregs inducidos se caracterizan por la capacidad de secretar citoquinas que inhiben de forma directa a los linfocitos T efectoras y transforman a las células dendríticas en células presentadoras de antígeno con acción supresora (Wei 2006). Dependiendo del tipo de citoquina producida, se subdividen en varios grupos: 1) Tregs tipo I secretoras de IL-10; 2) Tregs productores de TGF- β (también denominados células T_H3) y 3) Tregs secretoras de IL-35 (Mouglakakos 2010). Mediante la secreción de estos mediadores químicos, fundamentalmente la IL-35, las células Treg inducidas son capaces de extender la capacidad inmunosupresora a otros linfocitos; su similitud con la diseminación de un proceso infeccioso ha llevado a denominar a este fenómeno como “tolerancia infecciosa” (Chaturvedi 2011).

Se ha observado la presencia de un número de Tregs superior al existente en individuos sanos en pacientes con carcinoma de pulmón no célula pequeña tanto en el tejido tumoral como en sangre periférica (Woo 2001, Okita 2005). Entre los distintos factores responsables de dicho incremento estaría, como se ha mencionado previamente, la expresión intratumoral de COX-2 y de linfopoyetina tímica estromal. Algunos autores han demostrado que el incremento de Tregs se correlaciona con la presencia de metástasis ganglionares y se asocia a un peor pronóstico (Suzuki 2001, Dimitrakopoulos 2011, Tao 2012). En pacientes con cáncer, y por su acción inhibidora del sistema inmune, la activación de las células Treg facilitaría el crecimiento y la diseminación de las neoplasias; de hecho, estas células son consideradas los más potentes inhibidores de la inmunidad antitumoral (Zou 2006). Este efecto de tolerancia inmunológica es realizado bien por acción supresora directa sobre la función de los linfocitos T o bien mediante la secreción de citoquinas inmunosupresoras como la interleukina 10 (IL-10) o el factor de crecimiento tumoral beta (TGF- β) (Thornton 1998, Hawrylowicz 2005).

d) Las células supresoras derivadas de la serie mieloide (MDSCs)

Las células derivadas de la serie mieloide con acción supresora (MDSCs) reúnen un grupo heterogéneo de células inmaduras de estirpe mieloide y progenitores de serie mieloide originadas en la médula ósea. En condiciones normales y en individuos sanos estas células se diferencian con rapidez en monocitos, granulocitos o células dendríticas. Sin embargo, en situaciones de septicemia, traumatismos y/o enfermedades autoinmunes, se produce un

bloqueo parcial de su diferenciación que conlleva su expansión inicial y posterior liberación en el torrente sanguíneo. Este fenómeno se ha observado también en pacientes con cáncer, incluyendo aquéllos con CPNCP; en ellos, el número de MDSCs en el bazo, en la sangre periférica y en los órganos afectados por la neoplasia aparece significativamente incrementado (Almand 2001). En este mismo sentido, se ha observado que en los pacientes con CPNCP que respondían al tratamiento quimioterápico y en aquéllos tratados con cirugía se producía una reducción de la subpoblación de MDSC que aparecía incrementada antes del tratamiento (Liu 2010). Algunos de los mecanismos por los que las MDSCs contribuyen a la aparición de tolerancia inmunológica en el microambiente tumoral son: 1) la inhibición de la activación de las células T, de modo inespecífico o mediante mecanismos antígeno-específicos, alterando la capacidad de las moléculas de histocompatibilidad clase I (MHC-I) de presentar péptidos antigénicos en las células tumorales (Lu 2011); 2) la inhibición de las células dendríticas (Cheng 2008) y 3) la expansión de la población de Tregs (Hoechst 2008, Pan PY 2010). Además, algunos estudios han demostrado que las MDSCs están implicadas en la angiogénesis, vasculogénesis y diseminación metastásica de las neoplasias mediante la secreción de MMP-9 y de TGF- β 1 (Finke 2011). Estos efectos están mediados por la producción por parte de estas células de óxido nítrico, peroxinitrito y sustancias reactivas derivadas del oxígeno, y también por la secreción de IL10 y TGF- β (Ostrand-Rosenberg 2010). Además, las MDSCs producen una regulación al alza de la actividad de la arginasa-I, que produce una depleción del aminoácido esencial L-arginina, lo que contribuye a la inducción de tolerancia en las células T a través de la regulación a la baja de la expresión de la cadena CD3 ζ del receptor TCR (Youn 2010). No obstante, estos mecanismos de supresión de la respuesta inmune dependen en gran medida de las condiciones del microambiente (Ostrand-Rosenberg 2012).

Por las razones expuestas, la utilización *in vivo* de fármacos dirigidos contra las MDSCs como el 5-fluoruracilo, gemcitabina, sunitinib, imatinib, dasatinib abren un prometedor campo en el tratamiento del cáncer (Ugel 2009, Vincent 2010, Apetoh 2011, Kao 2011). Se ha demostrado en ratones que el tratamiento con ácido trans-retinoico, con la ayuda de las células T *natural killer* (NK), convierte a las MDSCs pobremente inmunogénicas en APC eficientes, incrementando de esta manera la respuesta inmune antitumoral (Lee 2011). Más recientemente se han publicado estudios que demuestran la actividad supresora o inductora de diferenciación de las MDSCs de otros fármacos como la curcúmina, IL-10, vitamina D3 y 5-aza-2'-deoxicitidina, así como la eficacia del uso de agentes que disminuyen la actividad de la arginasa; dado que algunos de ellos están ya aprobados por la FDA para el tratamiento de enfermedades distintas al cáncer, estos agentes podrían constituir en los próximos años una prometedora vía de investigación para vencer la inmunosupresión asociada a los tumores en fase avanzada (Apetoh 2011).

1.2. Los infiltrados linfoides asociados al tumor (TILs)

El primer paso en la expansión y diferenciación de los linfocitos T citotóxicos antitumorales es la presentación de los antígenos presentes en las células neoplásicas que han llegado a los ganglios linfáticos de drenaje del tejido tumoral mediante las APC. Este paso permite la liberación a la circulación y la posterior migración al tejido tumoral de linfocitos T citotóxicos; dicha migración está mediada por interacciones complejas con diversos receptores de adhesión reguladas por la influencia de distintos factores quimiotácticos. Una vez situados en el interior del tumor, estos linfocitos T citotóxicos modificados se disponen en agregados denominados “infiltrados linfoides asociados al tumor” (del inglés “*tumor infiltrating lymphocytes*” o TILs) (Aerts 2013). Tal y como se ha descrito previamente, las células dendríticas son las principales células APC de entre las que se encargan de realizar este paso esencial para la diferenciación de los linfocitos T citotóxicos.

La interacción directa entre las células tumorales y los TILs puede llevar a una regulación a la baja de la cadena CD3 ζ y de tirosín-kinasas específicas en los linfocitos asociados al tumor: ello conduciría a un empeoramiento en la función de los receptores de señales de los linfocitos T, que en última instancia inhibiría su función lítica y bloquearía la fase efectora antitumoral. Algunos autores sugieren que la expresión de receptores de ligandos de muerte celular como FasL, TRAIL o RANTES en la propias células tumorales o en los exosomas liberados por éstas es capaz de inducir apoptosis en los linfocitos T activados, incluso en aquéllos situados en localizaciones alejadas del tumor (Abusamra 2005).

1.3. El papel de los macrófagos

Los macrófagos son componentes habituales del sistema inmune originados en la médula ósea a partir de sus precursores, los monocitos. Desde la década de los 60 es un hecho conocido que son células esenciales para la defensa antibacteriana, y que su activación *in vivo* es realizada por los linfocitos T (Mackaness 1964). Aunque inicialmente se desconocía el mecanismo por el cual los macrófagos eran capaces de destruir microorganismos, más adelante se descubrió que esta actividad se llevaba a cabo a través de la producción de óxido nítrico (ON); además, mediante la liberación de esta sustancia, los macrófagos también podían eliminar células tumorales (Hibbs 1987). Este dato se vio apoyado tras la observación de que los macrófagos localizados en un tumor que está intentando ser eliminado por el sistema inmune producen enormes cantidades de ON (Mills 1992). Posteriormente, otros autores observaron que en heridas estériles los macrófagos producen grandes cantidades de ornitina, una molécula precursora de las poliaminas necesaria para la proliferación celular y por tanto fundamental para llevar a cabo los procesos de reparación tisular (Albina 1990). Recientemente se ha observado que los macrófagos presentes en los infiltrados inflamatorios asociados a las neoplasias también producen esta sustancia en cantidades significativas, y además otras moléculas de conocida acción promotora del crecimiento como

VEGF, EGF y TGF β (Mills 2015). Así pues, estas células son capaces de producir al mismo tiempo óxido nítrico, con acción inhibidora del crecimiento celular, y ornitina, con acción estimuladora; esta producción tiene como sustrato la arginina, que se procesa bien por la vía enzimática de la sintasa del óxido nítrico, bien por la vía de la arginasa para dar lugar a una u otra sustancia, respectivamente (Mills 2001, Mills 2012). Los macrófagos son, por tanto, células con una característica única, esto es, la doble capacidad de reparar y/o destruir dependiendo de las circunstancias (Mills 2015). En función del predominio de una u otra capacidad se ha clasificado a estas células en dos subpoblaciones: los macrófagos tipo M1, con actividad *killer* y/o inhibidora del crecimiento celular, y los macrófagos M2, promotores del crecimiento y la reparación (Mills 2000).

La verdadera relevancia de los macrófagos en la composición de los infiltrados inflamatorios relacionados con los tumores se puso de manifiesto cuando la dificultad para identificar en las neoplasias antígenos específicos a fin de diseñar terapias dirigidas condujo la investigación al estudio de las posibilidades de activar el sistema inmune contra el tumor (Mills 2012). De hecho, la mayor parte de los tumores carece de dichos antígenos distintivos, con lo que los procesos de promoción e inhibición del crecimiento tumoral tienen lugar a través de mecanismos “innatos” (Mills 1992, O’Sullivan 2012). La importancia de la actividad directa de los macrófagos en la evolución del cáncer se ve sustentada por las observaciones realizadas en otras especies. Así, en animales invertebrados, que carecen de linfocitos T y B, la incidencia de cáncer es baja, lo que apoyaría la hipótesis de que los macrófagos y la inmunidad innata desempeñan un importante papel en la inhibición de la aparición y crecimiento de los tumores (Robert 2010, Wang J 2015). Además, los animales en los que predomina la actividad de la subpoblación M1 de los macrófagos muestran una incidencia de tumores inferior a la de aquéllos en los que la actividad dominante es la de los macrófagos M2 (Evans 1977, Mills 2000, Mills 2015). Esto podría estar en relación no solo con la actividad intrínseca de la subpoblaciones de macrófagos, sino con su capacidad de modificar la actividad de los linfocitos T y B haya o no presentes antígenos específicos de tumor. En este sentido se ha demostrado que los macrófagos tipo M1 inducen en las células T *naïve* una respuesta tipo Th1/citotóxica; esta respuesta puede además amplificar la actividad M1 *killer* mediante la producción de IFN γ (Mills 2015). Esta modulación regularía el proceso de eliminación del tumor; hay que tener en cuenta que la destrucción del tejido tumoral por el ON, una vez desencadenada su liberación, es inespecífica e indiscriminada (Hibbs 1987). En contraposición, los macrófagos tipo M2, a través de la liberación de TGF β y de IL-10, transforman a los linfocitos T en Tregs e inducen en ellos respuestas sin actividad antitumoral; además, esta subpoblación estimula una respuesta tipo Th2 asociada a la producción de anticuerpos (Mills 2000, Ruffell 2015).

Sin embargo, la participación de los macrófagos en la evolución de los tumores no se limita a los mecanismos “innatos”. Es un hecho conocido que estas

células no solo son necesarias para presentar antígenos a los linfocitos T, sino que, al estar dotadas de receptores tipo Toll (entre otros), tienen la capacidad de reconocer patógenos de forma directa y específica (Medzhitov 1997). Así, además de su actividad inmunológica “innata”, los macrófagos son capaces de desencadenar respuestas inmunes adaptativas. Esto es especialmente importante cuando en una neoplasia existen antígenos específicos; en estos casos, la inmunidad adaptativa dirigida por los macrófagos desencadena la estimulación de linfocitos T citotóxicos contra dichas dianas antigénicas tumorales, limitando la acción destructiva indiscriminada y disminuyendo por tanto los efectos colaterales; en estos casos la actividad de los macrófagos es capaz además de generar “memoria inmunológica” en los linfocitos T y B (Mills 2015).

Se ha demostrado que la potenciación de la subpoblación M1 resulta en inhibición tumoral (Beatty 2011, Ruffell 2015). Además, recientemente se han aportado evidencias de que los macrófagos tipo M2 pueden ser modulados y transformados en macrófagos tipo M1, y que esta modulación es capaz de producir el “rechazo” del tejido tumoral (Mills 1992, Beatty 2011, O’Sullivan 2012). Sin embargo, en la mayoría de las neoplasias la población predominante de macrófagos corresponde al tipo M2; este hecho podría explicarse por la liberación en el microambiente tumoral de sustancias como PGE2 y TGF β , capaces de inhibir la activación de los macrófagos tipo M1 (Noy 2014, Ruffell 2015). Además de a los factores humorales citados, la menor actividad de los macrófagos M1 en las neoplasias también es atribuible a la ausencia de antígenos tumorales específicos (Albina 1990). A su vez, ambos factores (las moléculas liberadas en el microambiente tumoral y la ausencia de antígenos tumorales específicos) desempeñan un papel importante en la limitación de otras respuestas antitumorales innatas, como la activación de las células *natural killer*. Estas células destruyen las células neoplásicas, de forma directa o mediante la activación de los macrófagos tipo M1 a través de la liberación de IFN γ (O’Sullivan 2012).

La evidencia previamente expuesta sustenta el desarrollo de las nuevas terapias basadas en los macrófagos mediante la inducción de sus diversos mecanismos de acción (fig. 5). Las basadas en la actividad inmune innata de los macrófagos tipo M1 se denominan MIC1 (*macrophage-innate conversión therapy*), mientras que los basados en su actividad inmunitaria adaptativa han recibido el nombre de MAC1 (*macrophage-adaptive conversión therapy*). Pese a que el aumento de la respuesta de los macrófagos M1 y de otros mecanismos de respuesta inmune innata o adaptativa mediante las terapias MIC1 y MAC1 tiene una acción beneficiosa contra el cáncer, en los primeros ensayos se han observado efectos secundarios importantes; así, se ha demostrado la asociación de la potenciación de las respuestas M1-Th1 citotóxicas produce y/o contribuye a la aparición de arterioesclerosis y de otras enfermedades inflamatorias crónicas (Mills 2012, Mills 2014, Mills 2015). El avance en el conocimiento de los mediadores implicados en estos efectos y el desarrollo de nuevos fármacos contribuirá a obtener el mayor

beneficio antitumoral de estas prometedoras terapias, disminuyendo los efectos indeseables.

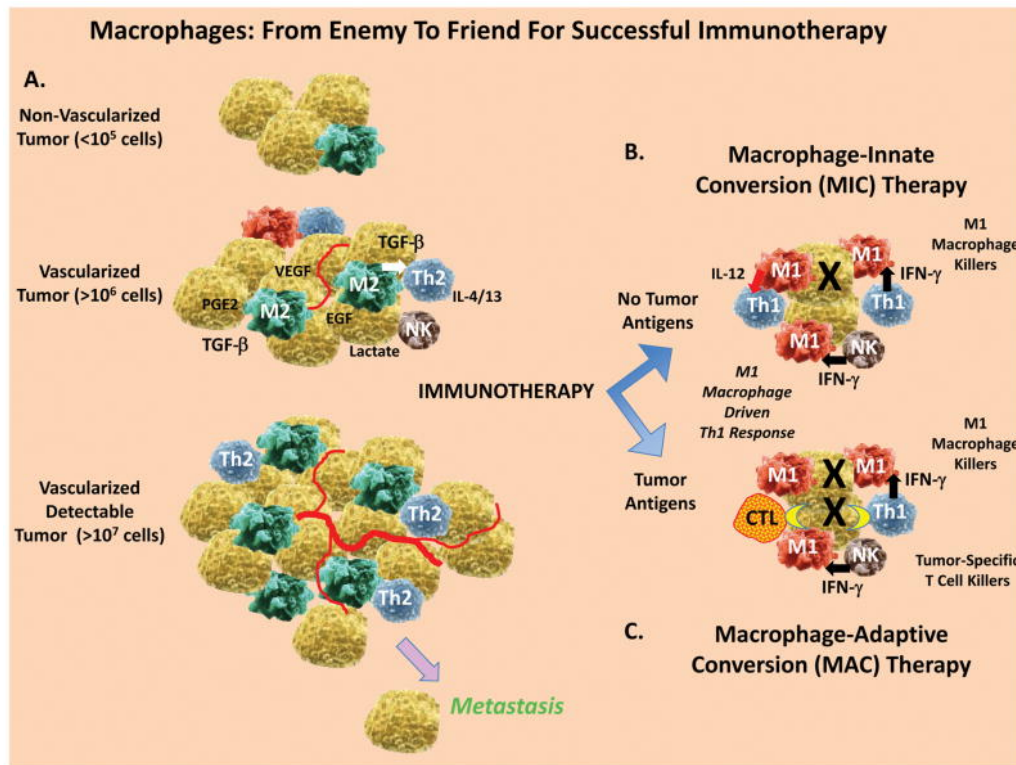


Fig 5. Inmunoterapia basada en la actividad de los macrófagos (De: Mills CD et al. Cancer Res 2016).

2. Tipos de inmunoterapia

A la vista de lo descrito previamente, la optimización de la función de los linfocitos T citotóxicos de forma previa a la administración de tratamientos inmunomoduladores es probablemente un paso esencial para incrementar la eficacia de estos agentes terapéuticos (Aerts 2013). Las terapias deberían entonces ir dirigidas a la “reactivación” del sistema inmunitario frente al tumor (Borczuk 2015). Como en otros sistemas biológicos, en el funcionamiento del sistema inmune intervienen rutas de activación y rutas de inhibición, cada una de ellas con sus puntos de control claves e interacciones complejas y/o redundantes. La base teórica de la inmunoterapia, cuyo objetivo es mejorar la respuesta inmune dirigida específicamente contra el tumor (Aerts 2013), se fundamentaría pues en los denominados “puntos de control inhibitorios” del sistema inmune; son señales con acción inhibitoria que regulan a la baja la respuesta del sistema inmune mediada por linfocitos T, a los que se considera cruciales en la actividad inmunológica en los tejidos periféricos y en el mantenimiento de la tolerancia autoinmunitaria. Algunos estudios han demostrado que este procedimiento, ya sea como tratamiento único o bien en combinación con otros, es una de las opciones terapéuticas con mayores posibilidades de éxito (Sundar 2014, Domingues 2014).

2.1. Inmunoterapia pasiva

Esta modalidad de inmunoterapia utiliza agentes inmunológicos obtenidos *in vitro* que son capaces de modificar la respuesta de los linfocitos T efectores. Los agentes más habituales son los anticuerpos monoclonales y las citoquinas recombinantes. La unión de las citoquinas IL-2, IL-7, IL-15 e IL-21 al receptor y de los linfocitos T (IL-2RG) aumenta *in vivo* la expansión de las células T y prolonga su persistencia en el lugar de acción. Los anticuerpos monoclonales ejercen su acción inmunomoduladora bien mediante la inhibición de las moléculas o células con acción inmunosupresora, bien mediante la activación de moléculas con acción estimuladora del sistema inmune. Algunos ejemplos de este grupo de agentes serían los anticuerpos monoclonales dirigidos frente a CTLA-4, PD-1, PD-L1, TIM-3 y BTLA, que son capaces de prevenir el bloqueo de la acción efectora de las células T. Algunos de ellos (anti-CTLA-4, anti-PD-1 y anti-PD-L1) han sido evaluados en ensayos clínicos sobre pacientes con carcinoma de pulmón, y están siendo testados en la actualidad en ensayos fase III como tratamientos de primera línea (en el caso de anti-CTLA-4) o de segunda-tercera línea (anti-PD-1). El perfil de toxicidad de estos agentes en el carcinoma de pulmón es similar al observado en otras neoplasias e incluye fundamentalmente procesos relacionados con la autoinmunidad como colitis e hipofisitis. La experiencia creciente con este tipo de terapias demuestra que una intervención precoz mediante tratamientos con corticoides a dosis altas reduce significativamente los casos de toxicidad grado 3 y 4 (Aerts 2013).

Además de las descritas, existe otra variante de inmunoterapia pasiva basada en la depleción de VEGF del ambiente tumoral mediante el uso de anticuerpos monoclonales específicos como el bevacizumab. La presencia en el microambiente de VEGF ejerce una acción supresora sobre el sistema inmunitario, por lo que su bloqueo contribuiría a la reactivación de los mecanismos antitumorales. Este procedimiento tiene un efecto añadido sobre las células dendríticas: incrementar su función activadora de los linfocitos T (Aerts 2013).

2.2. Inmunoterapia activa

La inmunoterapia activa se basa en la estimulación *in vivo* de las células efectoras del sistema inmune, ya sea mediante el suministro de mediadores inmunológicos o bien mediante la administración directa de células con capacidad de activar el sistema inmunológico. Uno de los procedimientos se basa en la transferencia de células T “adoptivas” previamente expandidas y/o activadas *ex vivo* (Tey 2006, Sun 2011). Este método parte de la dificultad de que el número de linfocitos T citotóxicos en sangre periférica es muy reducido, y los TILs pueden ser escasos o incluso inexistentes (Tey 2006). Una alternativa a esta técnica sería la transferencia de linfocitos T autólogos no solo previamente expandidos *ex vivo*, sino a los que además se ha modificado generando un receptor antigénico TCR quimérico; este procedimiento sería especialmente prometedor en los casos en los que se conozcan los antígenos del tumor (Chinnasami 2011). Aunque la transferencia de estos linfocitos

modificados dirigidos frente a antígeno permitiría soslayar la acción inhibitoria ejercida por el microambiente tumoral, habría no obstante limitaciones relacionadas tanto con la especificidad de acción de estas células como con la probablemente amplia diversidad de antígenos expresados por algunos tumores (Aerts 2013). Esta última razón es la que limita el empleo de vacunas elaboradas a partir de determinados epítomos TAA en los pacientes con CPNCP; dado que el número de péptidos específicos del carcinoma de pulmón que se conoce es relativamente bajo, para que el procedimiento fuera verdaderamente eficaz sería necesario un tipado completo de MHC (Chinnasami 2011). Esta necesidad de identificación “masiva” de péptidos podría eludirse únicamente si se inmunizara al paciente con la totalidad de proteína TAA. Estas proteínas serían asimiladas por las APC (principalmente las células dendríticas) y posteriormente procesadas de forma endógena dando lugar a epítomos susceptibles de ser presentados a los linfocitos; no obstante, al no tratarse de proteínas directamente tomadas de las células tumorales, tal y como sucede en condiciones normales, el mecanismo perdería al menos parte de su carácter específico (Aerts 2013). A ello hay que añadir el bloqueo que las células cancerosas ejercen *in vivo* sobre la función de las APC (Schneider 2011). Así pues, y aunque hay evidencia de que las células dendríticas pueden ser estimuladas *in vivo*, la eficacia clínica real de dicha estimulación es limitada (Aerts 2013). Una alternativa a este procedimiento es la estimulación *ex vivo* de las células dendríticas y su posterior inyección en el paciente. Este sistema ha sido probado recientemente en un ensayo de pacientes con carcinoma de próstata metastásico resistente a la castración química, en los que consiguió aumentar la supervivencia, demostrando que cuando las células dendríticas son adecuadamente estimuladas y “cargadas” con antígenos de amplio espectro son capaces de activar diversos tipos celulares y generar linfocitos T citotóxicos con acción antitumoral; este resultado contribuye a incrementar la evidencia de la utilidad de la inmunoterapia basada en células en los tumores sólidos (Madan 2011). El empleo de las células dendríticas en inmunoterapia requiere pues el empleo de células adecuadamente estimuladas; los principales inconvenientes de este tipo de procedimiento son, a la vista de lo previamente expuesto, su complejidad y su elevado coste. Por tanto, y aún constituyendo una posibilidad prometedora, su aplicación en las terapias contra el cáncer está todavía lejos de ser incluida en la práctica habitual (Aerts 2013).

En relación con el objetivo primordial de aumentar la eficacia de los linfocitos T efectores se sitúan las estrategias dirigidas a soslayar la acción inhibidora del sistema inmune mediada por las células T reguladoras o Tregs. Los procedimientos existentes hasta la fecha son: 1) la depleción de células Treg mediante procedimientos como la linfoablación química o radioterápica, la administración de anticuerpos monoclonales o toxinas dirigidas frente a CD25 (daclizumab, basiliximab, denileukin difitox, RFT5-SMPT-dgA y LMB-2) o con ciclofosfamina metronómica; 2) la supresión de la función de las células Treg con fármacos como ipilimumab, tremelimumab (anti-CTLA4), DTA-1 (anti-GITR), denosumab (anti-RankL), mediante la modulación del receptor Toll-like

o la estimulación de OX40 o inhibiendo la hidrólisis de ATP con inhibidores de ectonucleotidasas; 3) el bloqueo del reclutamiento y retención selectiva de células Treg en los lugares de localización del tejido tumoral con agentes como CCR2, CXCR4, CD103 y CCR2; y 4) el aprovechamiento de la plasticidad de los linfocitos T mediante la modulación de la expresión de IL-6, TGF- β y prostaglandina E2 (PGE2), ésta última con el inhibidor de COX-2 celecoxib (Byrne 2011).

III. EL RECEPTOR PD-1 Y SUS LIGANDOS

1. Caracterización y función biológica

PD-1 (*Programmed cell death protein 1*), también denominada receptor CD279 (Sundar 2014, Drake 2014), es una proteína transmembrana tipo 1 perteneciente a la superfamilia CD28 de las inmunoglobulinas que se expresa en gran parte de las células de estirpe hematopoyética: linfocitos B y T, células natural-killer, células T-natural killer, células dendríticas, mastocitos y macrófagos (Ishida 1992, Sharpe 2007, Keir 2008, Brahmer 2012, Ishii 2015). Esta proteína está implicada en la regulación de la activación y proliferación celular (Dong 2002, Pardoll 2012). Aun siendo habitual en las células hematolinfoides, no es exclusiva de éstas, habiéndose identificado también en la superficie de células endoteliales y epiteliales, incluyendo las neoplásicas (Sharpe 2007, Parsa 2007, Brahmer 2012). PD-1 aparece además sobreexpresada en la superficie de las células T “exhaustas” (Barber 2006). Su acción inmunomoduladora se basa fundamentalmente en el bloqueo de los linfocitos T activados, siendo considerado uno de los receptores clave en la inhibición de la acción del sistema inmunitario (Pardoll 2012, Topalian 2012). Además, se ha demostrado que su bloqueo va seguido de la recuperación de la función en las células T “exhaustas” (Barber 2006).

Los ligandos de la proteína PD-1, conocidos como ligandos de muerte programada, se denominan PD-L1 o CD274 y PD-L2 o CD273 (Latchman 2001, Intlekofer 2013). Ambos pertenecen a la familia B7, que incluye además los ligandos B7-H3 y B7-H4 (Sun Y 2006); por su pertenencia a dicha familia proteica PD-L1 y PD-L2 reciben también los nombres de B7-H1 y B7-DC (Sundar 2014, Drake 2014). PD-L1 se expresa, al igual que PD-1, en células hematopoyéticas, en el endotelio y en células epiteliales nativas y neoplásicas, habiéndose descrito en una gran variedad de tumores: carcinoma de pulmón, melanoma, glioblastoma, carcinoma de cabeza y cuello, estómago, colon, páncreas, mama, ovario, cérvix y útero, así como en neoplasias hematolinfoides como el mieloma múltiple, linfoma y varios tipos de leucemias (Dong 2002, Curiel 2003, Wu 2006, Nomi 2007, Berger 2008, Brahmer 2013).

La interacción entre las moléculas de PD-1 expresadas en la membrana celular de los linfocitos T efectores y las moléculas de PD-L1 de las APC es uno de los puntos de control del sistema inmunitario destinados tanto a restringir el daño tisular secundario a la respuesta inmune desencadenada tras una

infección o un proceso inflamatorio como a inhibir respuestas autoinmunes (Yang CY 2014, Wang A 2015). La unión de PD-L1 al receptor PD-1 es capaz de inhibir la señalización celular mediada por el receptor de células T disminuyendo la interacción de éstas con las células dendríticas, lo que conduce a la anergia (Borczuk 2015). Este bloqueo se produciría también en la respuesta inmune mediada por células T frente a los tumores (Latchman 2001, Zou 2008, Intlerkofer 2013). En este sentido se ha postulado que la expresión de PD-L1 por las células neoplásicas es uno de los mecanismos de “escape” del sistema inmune; la interacción entre la molécula de PD-L1 de las células tumorales y el receptor PD-1 de los linfocitos T daría como resultado un cese de actividad linfocitaria antitumoral (Borczuk 2015). En el carcinoma de pulmón esta hipótesis se ve apoyada por dos observaciones: 1) los pacientes con CPNCP tratados quirúrgicamente cuyas células neoplásicas expresan PD-L1 tienen una menor supervivencia post-quirúrgica (Yang 2014, Wang A 2015) y 2) en el CPNCP la expresión de PD-L1 experimenta una regulación al alza, detectándose en las células tumorales en proporciones de entre el 40 y el 50%, independientemente del subtipo histológico (Mu CY 2011, D’Incecco 2015).

En los tumores, PD-1 y PD-L1 se expresan no sólo en las células neoplásicas, sino también en la mayoría de los TILs. Dicha expresión está además regulada de forma recíproca; así, algunos estudios han demostrado que la expresión de PD-L1 en células tumorales y en células del sistema inmunitario está fuertemente asociada con la expresión de PD-1 en los TILs. Este hecho indicaría que: 1) la expresión de PD-L1 es el reflejo de la existencia de un microambiente inmunológico reactivo (Taube 2012) y 2) la presencia de altos niveles de PD-1 en los linfocitos citotóxicos es muy sugestiva de que en dicha circunstancia se está produciendo la proliferación de linfocitos T y la disminución concomitante de producción de citoquinas (Konishi 2004).

Los mecanismos por los cuales las células epiteliales neoplásicas desarrollan la capacidad de expresar PD-L1 no están aún descritos. Hasta la fecha se sabe que para ello utilizan algunas de las rutas oncogénicas de señalización ya conocidas, como la de fosfoinositidina 3-quinasa/proteín-quinasa B (PI3/PKB), la vía de las quinasas reguladas por señalización extracelular/proteín-quinasas activadas por mitógenos, la quinasa Janus (JAK/STAT), la vía gen 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloide/factor 6 asociado al factor de necrosis tumoral; también se ha demostrado su activación en respuesta a citoquinas producidas por un infiltrado inflamatorio, como el interferón (Taube 2012, Francisco 2010, Qin 2010, Liu 2007, Parsa 2007, Marzec 2008, Crane 2009, Jiang X 2013). La expresión de PD-L1 puede además depender del tipo histológico de la célula neoplásica (Teixidó 2015). Por otra parte, dado su complejo funcionamiento, cabe la posibilidad de que existan en el sistema inmunitario puntos de control adicionales que modulen la respuesta a la terapia anti-PD-L1 y tengan además valor como marcadores predictivos. Los más prometedores en este sentido son:

1) PD-L2: su expresión parece influir en el resultado del tratamiento con pembrolizumab, y podría además explicar algunos de los casos de respuesta a la terapia observados en pacientes PD-L1 negativos (Yearley 2015).

2) Interferón gamma (IFN γ): se ha valorado su expresión inmunohistoquímica en combinación con la de PD-L1 como factor predictivo de respuesta a durvalumab (Higgs 2015).

3) RNA mensajero (mRNA) de genes de respuesta inmune: hasta la fecha existen pocos datos sobre los mecanismos de “escape” de la acción del sistema inmunitario utilizados por las neoplasias así como sobre la composición e intensidad de los TILs en relación a la respuesta a los inhibidores de los puntos de control del sistema inmunitario (Galon 2014). El estudio del mRNA de los genes inmunitarios puede ser muy útil en este sentido; se ha identificado una “firma” genética con valor predictivo de respuesta a la vacunación con MAGE A3 en el CPNCP (Ulloa-Montoya 2013). En relación a la expresión de PD-L1, se ha descrito que en los casos con niveles más altos de positividad para dicho marcador en los infiltrados inmunes asociados a tumor no se observan tasas elevadas de expresión en las células tumorales (Gettinger 2015).

4) *EGFR*: un estudio reciente ha revelado que la inhibición PD-1/PD-L1 es más eficaz en pacientes con carcinoma de pulmón no célula pequeña que muestran mutaciones somáticas de *EGFR*. Así, se demostró que la positividad para PD-L1 estaba significativamente asociada con la presencia de mutaciones de *EGFR*, y que dicha relación se traducía en que los pacientes PD-L1 positivos mostraban una sensibilidad más alta a los inhibidores de *EGFR*, un tiempo de progresión tras la terapia más largo y mejor supervivencia global que los pacientes negativos para dicho marcador (Akbay 2013, Ji 2015).

El desarrollo y aplicación de los tests inmunohistoquímicos de valoración de PD-L1 ha traído consigo que la clásica relación “un test-un ensayo” quede obsoleta (Sholl 2015). Su aplicación ha conllevado la introducción de dos nuevos conceptos, el de herramienta diagnóstica “complementaria” frente a “acompañante”. Según queda definido por la *US Food and Drug Administration* (FDA), el test diagnóstico acompañante es aquél cuya realización es “esencial para el uso seguro y efectivo de un producto terapéutico correspondiente”, y de forma característica se diseña y perfecciona de forma simultánea con su desarrollo clínico (US FDA 2014). La definición de test diagnóstico complementario no ha sido formalmente establecida por la FDA; la más recientemente propuesta se formuló tras la aprobación de Opdivo (nivolumab), y lo describe como “un test que no es exigible para la administración de un determinado agente terapéutico pero que puede ser utilizado para identificar a los pacientes con mayor probabilidad de verse beneficiados con su uso” (Ray 2015). Los tests diagnósticos acompañantes suponen pues un grado mayor de flexibilidad (Sholl 2015). El test inmunohistoquímico de detección del clon de PD-L1 28-8 (Dako®) en asociación con la terapia con nivolumab constituye un ejemplo de test diagnóstico complementario; su uso ha sido aprobado como

parte de las pruebas destinadas a diseñar el tratamiento del CPNCP no escamoso, si bien sin que su aplicación en este contexto sea obligada (Sholl 2015).

2. PD-1 y PD-L1 en inmunoterapia

Los hechos descritos sustentan la base teórica de la utilización en la inmunoterapia del cáncer de anticuerpos dirigidos tanto frente a PD-1 como a sus ligandos de la familia B7; de entre ellos, PD-L1 es el más estudiado en los ensayos clínicos de cáncer de pulmón (Sun 2006). La unión de anticuerpos dirigidos bien frente a PD-1 bien frente a su ligando PD-L1 produciría el bloqueo de la interfase receptor-ligando; ello restaura la actividad de los linfocitos T, que en consecuencia incrementarían la respuesta inmune antitumoral. El bloqueo de dicha interacción sería especialmente útil en aquellas neoplasias que para su desarrollo utilizan mecanismos de “escape” del sistema inmune, especialmente los CPNCP, que de forma habitual expresan gran número de neoantígenos (Schrieber 2011, Kerr 2015). La primera evidencia sobre la utilidad terapéutica de dicho bloqueo se obtuvo de modo indirecto tras la realización de ensayos clínicos con antagonistas del regulador de células T CTL4A como ipilimumab, cuya inactivación lleva aparejado el bloqueo de PD-1; el uso de estos fármacos produce un incremento en la supervivencia de pacientes con melanoma metastásico y con otros tipos de tumores sólidos refractarios al tratamiento (Couzin-Frankel 2013). En la actualidad están en desarrollo varios ensayos clínicos en fase III en pacientes con melanoma maligno, linfoma no Hodgkin, carcinoma de células renales y carcinoma de mama triple-negativo, con resultados iniciales positivos (Brahmer 2010, Brahmer 2012, Topalian 2012, Taube 2014).

En el carcinoma de pulmón se han desarrollado hasta la fecha numerosos anticuerpos monoclonales primarios dirigidos bien frente a PD-1 bien frente a su ligando PD-L1 (Tabla 3). Algunos de ellos van asociados al empleo de determinado fármaco: nivolumab, pembrolizumab (en el caso de PD-1) y atezolizumab, durvalumab y avelumab (para PD-L1) (Tablas 1 y 2). Los fármacos atezolizumab y durvalumab ya han demostrado su efecto beneficioso en diferentes tipos de tumores (Herbst RS 2014, Stewart 2015, Reblatto 2015). Ambos son anticuerpos monoclonales que se unen a PD-1 sin activarlo, y como consecuencia bloquean su unión con el ligando PD-L1 (Borczuk 2015).

En el carcinoma de pulmón, diversos ensayos clínicos han demostrado el efecto beneficioso del tratamiento con inhibidores de PD-1 como pembrolizumab y nivolumab en estadios avanzados, poniendo de relieve su actividad antitumoral con un perfil de toxicidad aceptable. El primero de ellos (pembrolizumab) ha sido aprobado por la FDA en el tratamiento en el CPNCP *EGFR* y *ALK* negativo, y el segundo (nivolumab) en CPNCP escamoso y no escamoso como terapias de segunda línea en pacientes en progresión tumoral durante o después de la quimioterapia basada en platino (Garon 2015, Borghaei 2015, Borczuk 2015). En la actualidad están en desarrollo dos ensayos clínicos con nivolumab:

-Un ensayo aleatorio en fase III en el que se compara, como primera línea de tratamiento, en pacientes con CPNCP PD-L1+, en estadio IV o en recidivas, con un fármaco quimioterápico elegido por el investigador (gemcitabina, cisplatino, carboplatino, paclitaxel o perimetrexed)

-Un segundo ensayo en fase I en pacientes con carcinoma de pulmón estadio IIIb/IV, como monoterapia o en combinación con gemcitabina (Teixidó 2015).

La inmunoterapia anti-PD-1/PD-L1 está también siendo evaluada en el CPCP; en la actualidad están en desarrollo dos ensayos clínicos, el primero con demcizumab (NCT01859741), un anticuerpo monoclonal dirigido contra el ligando Delta-like4 (DLL4) y el segundo con nivolumab, como monoterapia o en combinación con ipilimumab (NTC 01928394), un anticuerpo monoclonal frente a CTLA-4) (Yang 2014, Massarelli 2014).

3. Utilidad clínica del testado PD-1/PD-L1

En la actualidad es ya habitual la realización en los servicios de Anatomía Patológica de técnicas inmunohistoquímicas y/o moleculares destinadas a seleccionar la población de pacientes que puede beneficiarse de determinados tratamientos quimioterápicos. Los test de detección de mutaciones de *EGFR* y los test moleculares de reordenamiento de *ALK* y *ROS1* se aplican de forma habitual en la práctica clínica. En el caso de estos marcadores, un resultado positivo tiene un valor predictivo de respuesta del 60-70%; el resultado permite además excluir del tratamiento a los pacientes con tumores negativos para dichas alteraciones moleculares, en los que la administración de los tratamientos específicos asociados no supondría mejora o incluso produciría efectos adversos (Kerr 2015). Esta situación “binaria” no sucede en el caso de PD-1/PD-L1. Algunos estudios sugieren que la detección de PD-L1 en un tumor mediante técnicas inmunohistoquímicas es capaz de predecir una respuesta clínica favorable a las terapias anti-PD-1/PD-L1 (Topalian 2012, Brahmer 2012, Taube 2014). La primera fase del ensayo clínico con nivolumab en pacientes con carcinoma de pulmón demostró que sólo aquéllos con tumores positivos para dicho marcador tuvieron tasas de respuesta objetiva, del 12% en carcinomas no escamosos y del 33% en la variante escamosa (Topalian 2012). En otros estudios, sin embargo, se evidenció que no todos los pacientes PD-L1 positivos responden (Wolchok 2013, Lipson 2013). Los resultados de correlación entre la expresión de PD-L1 y el impacto de dichos tratamientos sobre la supervivencia del paciente no son pues del todo concordantes, por lo que aún no puede ser considerado un biomarcador con verdadero valor predictivo (Grosso 2013).

La utilidad de la valoración inmunohistoquímica del status PD-L1 en el CPNCP en estadios avanzados a la hora de seleccionar los pacientes susceptibles de beneficiarse con este tipo de terapia se ha demostrado en algunos estudios. En ellos se describe una mayor tasa global de respuesta, mayor duración del periodo libre de enfermedad y mejor supervivencia global en los pacientes con tumores clasificados como PD-L1 positivos en el estudio inmunohistoquímico

frente a aquéllos con resultado negativo (Kerr 2015b). En estos ensayos las tasas de respuesta global de los pacientes PD-L1 positivos oscilan entre el 31 y el 52% (Garon 2015, Borghaei 2015, Yang 2014). Los resultados parecen estar en relación no sólo con la presencia o ausencia de expresión de dicho marcador, sino también con la mayor tasa o porcentaje de positividad, observándose una mayor respuesta a las terapias anti-PD-L1 a medida que la expresión en las células tumorales aumenta (Garon 2015, Spira 2015), con dos excepciones: los pacientes con CE PD-L1+ tratados en segunda o tercera línea con nivolumab, en los que los niveles de PD-L1 no resultaron ser un factor predictivo de mayor supervivencia frente al tratamiento con docetaxel (Brahmer 2013) y los pacientes tratados con atezolizumab (ensayo POPLAR), en los que la expresión fue valorada en los TILs. En estos últimos la mayor respuesta al tratamiento se observó en pacientes con alta expresión de PD-L1 en los TILs, y no en las células tumorales (Spira 2015).

Si bien ciertos ensayos clínicos han demostrado que los pacientes con ausencia de expresión de PD-L1 no obtienen beneficio del tratamiento dirigido contra este antígeno (Topalian 2012), también se han observado respuestas significativas en pacientes con tumores negativos en el estudio inmunohistoquímico (Wolchok 2013, Lipson 2013). Este hecho se ha puesto de manifiesto en varios estudios: un ensayo en fase I con el fármaco nivolumab, el que se recogieron tasas de respuesta objetivas del 44% en pacientes PD-L1 positivos y del 17% en pacientes con test negativo (Grosso 2013); un segundo ensayo en fase I con Atezolizumab (MPDL3280A) realizado sobre múltiples tipos de tumores sólidos, en el que se obtuvo una tasa de respuesta objetiva del 13% en los casos negativos (Herbst 2014); un tercer ensayo con pembrolizumab en pacientes con CPNCP en segunda o superior línea de tratamiento, con tasas de respuesta global de hasta el 16% (Garon 2015). No obstante, estas respuestas son en general discretas, con resultados en ocasiones simplemente no inferiores a las obtenidas tras tratamiento estándar con docetaxel, y en cualquier caso con menores tasas de toxicidad (Kerr 2015). De hecho, en los pacientes PD-L1 positivos, además de una mayor tasa de respuesta numérica se observó mayor supervivencia libre de progresión tumoral y mayor supervivencia global que en los pacientes PD-L1 negativos con respuesta objetiva al tratamiento (Grosso 2013). Estos resultados indicarían que, si bien la expresión de PD-L1 potencia el efecto en respondedores al tratamiento, su ausencia no es un indicador absoluto de carencia total de beneficio (Sholl 2015). Las posibles explicaciones a esta observación serían: 1) la probable heterogeneidad intratumoral de expresión de PD-L1 (McLaughlin 2015); 2) el carácter “no binario” de expresión de PD-L1 (ausente *versus* presente), sino en forma de un continuo que abarcaría desde la ausencia total de expresión hasta altos porcentajes de positividad, pasando por tasas intermedias; 3) la posible inducción de expresión de PD-L1 por el tratamiento quimio/radioterápico en primera línea o por inmunoterapia previa, lo que convertiría una neoplasia negativa para dicho marcador en fases previas al tratamiento en un tumor PD-L1 positivo (Kerr 2015). En este sentido, la valoración del status PD-L1 en la biopsia inicial puede ser muy

poco conveniente (Sholl 2015). Es pues de gran importancia determinar el momento en que debe realizarse el estudio inmunohistoquímico sobre el tejido tumoral (esto es, sobre biopsias adquiridas al diagnóstico frente a biopsias post-tratamiento), valorando cuidadosamente los riesgos de re-biopsiar al paciente a la hora de determinar el estatus PD-L1 que permitan planificar un hipotético tratamiento inmunoterápico (Kerr 2015, Sholl 2015). En la mayoría de los pacientes incluidos en ensayos de segunda o sucesiva línea el test se efectúa sobre el tejido tumoral de la biopsia inicial; aún no está claro si la realización de una nueva biopsia post-tratamiento proporcionaría un resultado más fiable, ni tampoco sobre qué test debería seleccionarse si se dispone de varios fármacos de los incluidos en los distintos ensayos (Kerr 2015). Con el estado actual de conocimientos, el diseño de un plan de tratamiento a medida, individualizado para cada paciente, parece ser la opción más adecuada (Kerr 2015).

En el momento actual, la expresión de PD-L1 en las células tumorales parece ser el mejor factor predictivo de respuesta a este tipo de inmunoterapia (Taube 2014). Existen no obstante casos en los que la positividad para PD-1/PD-L1 aparece únicamente en los TILs y no en las células neoplásicas, observándose expresión de PD-L1 en los macrófagos del estroma peritumoral o de la interfase estroma-tumor (TAMs) y de PD-1 en los linfocitos de la misma localización (Schultheis 2015). Este hecho, observado en un 25-30% de los casos, indicaría que la ruta está activada y que los pacientes PD-L1/PD-L2 positivos en las células inmunes asociadas al tumor podrían beneficiarse pues de esta terapia (Schultheis 2015). En este sentido, siguiendo la tendencia previamente mencionada de diseñar tratamientos individualizados, se ha propuesto la inclusión en los ensayos clínicos de tests inmunohistoquímicos en los que, además de evaluar la expresión de PD-1/PD-L1, se realice la caracterización inmunofenotípica de las células del microambiente tumoral; el análisis de los resultados podría ser de ayuda a la hora de investigar el significado y función de las células inmunes asociadas al tumor (Schultheis 2015).

En cuanto a la asociación de la expresión de PD-L1 en el CPNCP con otras variables clínico-patológicas, hasta la fecha no se ha conseguido demostrar correlación de ésta con la edad, el sexo, el hábito tabáquico, el tamaño tumoral, la variante histológica ni el estadio tumoral (Pan ZK 2015, Ilie 2016).

4. Evaluación inmunohistoquímica del status PD-1/PD-L1

4.1. Generalidades

En el momento actual, y a falta de que un mejor conocimiento de la biología de la interacción PD-1/PD-L1 permita el desarrollo de nuevos test de valoración, la determinación de ausencia o presencia de expresión de PD-L1 en las membranas celulares se realiza mediante técnicas inmunohistoquímicas efectuadas sobre tejido fijado en formol e incluido en parafina (Brahmer 2010, Brahmer 2012, Topalian 2012, Taube 2014). La evaluación del resultado se

basa en la valoración del porcentaje de células tumorales positivas para dicho marcador (Sholl 2015, Kerr 2015). La intensidad de tinción no se evalúa ni influye en el score en la mayoría de los estudios, con dos excepciones; 1) un ensayo en fase I con MPDL3280A (atezolizumab) sobre múltiples tipos de tumores en el que se utilizó la intensidad de tinción como criterio de estratificación de los pacientes, observándose tasas de respuesta objetiva del 46% en la cohorte con mayor intensidad, del 17% en los casos con intensidad moderada y del 21% en los pacientes con baja intensidad de tinción (Herbst 2014) y 2) un estudio de evaluación de PD-1/PD-L1 en el CPCP en el que se compara el resultado obtenido con técnicas inmunohistoquímicas frente a la evaluación mediante técnicas de cuantificación de la expresión génica basadas en mRNA (Schultheis 2015). Algunos de estos estudios valoran la presencia o ausencia de expresión de dicho inhibidor únicamente en las células neoplásicas, mientras que otros valoran también la positividad para dicho marcador en los TILs y en los macrófagos asociados al tumor (TAMs) (Topalian 2012, Powles 2014, Tumeh 2014, Herbst 2014, Garon 2015, Schultheis 2015); de hecho, en uno de los ensayos la mayor tasa de respuesta objetiva al tratamiento se encontró en la cohorte con porcentajes de positividad más altos en los TILs (Herbst 2014). En todos los ensayos los anticuerpos han sido evaluados sobre muestras de tejido; ninguno de ellos ha validado sus resultados en muestras citológicas, en las que, entre otras dificultades, sería difícil valorar resultados en el componente de células inmunes asociadas al tumor (Kerr 2015). Dado que la citología es en algunas instituciones el tipo de muestra predominante (Sholl 2015), el desarrollo de los tests en este tipo de material sería de gran utilidad. En el caso de los anticuerpos anti-PD-L1, cada uno de ellos identifica diferentes epítomos de la molécula dependiendo del clon utilizado, pudiendo estar dirigidos frente a su dominio extracelular (SP263, 22C3 y 28-8) o intracelular (E1L3N y SP142) (Sholl 2015). El empleo de clones diferentes puede por tanto dar resultados diferentes (Kerr 2015). La tinción puede además verse modificada en virtud del sistema químico de visualización utilizado. Por todo ello, en cada test el uso de un determinado clon lleva aparejada la utilización de un test de detección inmunohistoquímica concreto a la hora de valorar la positividad o negatividad del tejido tumoral para dichos antígenos. Los test están disponibles en forma de kits con instrucciones de uso muy precisas. Como en cualquier otro estudio inmunohistoquímico, el estado de conservación y fijación del tejido, su manipulación y procesamiento previos, incluyendo la fase de desenmascaramiento antigénico, son factores muy importantes en la valoración del resultado final. Las biopsias empleadas en el diagnóstico del cáncer de pulmón son realizadas habitualmente mediante procedimientos mínimamente invasivos, con lo que la cantidad de tejido es escasa. Parte de dicho tejido será utilizado ya de entrada para la realización de técnicas inmunohistoquímicas y/o moleculares complementarias destinadas a confirmar el diagnóstico o bien a valorar marcadores con valor predictivo establecido (*EGFR*, *ALK*, *ROS1*). Esto ocurre aún en mayor medida en el caso del CPCP, en el que, al no ser en principio subsidiario de tratamiento quirúrgico, la posibilidad de disponer de tejido adicional durante el curso de la enfermedad del paciente es muy reducida.

4.2. Patrones de tinción

En el estudio inmunohistoquímico de PD-L1 se han descrito dos patrones de tinción, ambos considerados válidos para clasificar una neoplasia como positiva para dicho marcador: el patrón membranoso y el citoplasmático (Teixidó 2015); algunos autores consideran no obstante el segundo patrón como tinción inespecífica y no lo valoran (Schultheis 2015). El patrón membranoso se define como positivo cuando se observa tinción circular completa de la membrana celular (Schultheis 2015); no existe una definición establecida para dar como positiva la tinción citoplasmática. Estos patrones son un reflejo de la propia naturaleza de PD-L1; al ser una proteína transmembrana, su identificación en el interior del citoplasma podría estar indicando la presencia del almacenamiento intracitoplasmático de ligandos susceptibles de ser reubicados en la superficie de la célula en respuesta a determinados estímulos (Teixidó 2015). Este patrón se ha descrito tanto en células tumorales como en células inflamatorias asociadas al tumor. No existen aún estudios comparativos concluyentes sobre las hipotéticas diferencias de valor predictivo de respuesta entre unos y otros patrones de tinción; como dato preliminar, algunos autores han observado que el patrón membranoso es el biomarcador principal a la hora de predecir la respuesta al tratamiento anti-PD-L1 (Brahmer 2012). Los tests de detección de PD-L1 existentes en la actualidad difieren en la valoración del patrón de tinción: mientras unos consideran positiva únicamente la tinción citoplasmática otros la restringen a la tinción membranosa, o bien dan como positivas ambas (Teixidó 2015, Schultheis 2015, Ishii 2015). Estas diferencias introducen un grado aún mayor de variabilidad en el score de positividad utilizado en los diferentes ensayos clínicos.

4.3. Scores de evaluación

La determinación de un punto de corte (o score) a partir del cual una neoplasia debe ser considerada positiva para PD-1 o PD-L1 es arbitraria y genera una situación “binaria” irreal; no obstante, hasta la fecha y a la espera del desarrollo de técnicas más precisas, este procedimiento parece ser el más adecuado (Dolled-Filhart 2015). En este sentido, las cuestiones a resolver son dos: 1) los criterios de tinción que definen a una célula individual como positiva o negativa, y 2) el porcentaje de células de un tumor que permita clasificarlo como positivo o negativo.

La positividad individual para PD-1/PD-L1 no ha sido aún bien definida. Algunos autores han basado su evaluación en métodos semicuantitativos análogos al sistema de Allred (Allred 1998). Así, en un estudio de expresión de PD-L1 en CPCP se valoró la intensidad de tinción subdividiéndola en 4 categorías: 0 (ausencia de tinción), 1 (tinción débil), 2 (moderada) y 3 (intensa) (Schultheis 2015). De forma paralela se valoró el porcentaje de células positivas, estableciendo seis categorías: 1 (20%), 2 (40%), 3 (60%), 4 (80%) y 5 (100%). Finalmente se sumaban los dos resultados, obteniendo una cifra de entre 0 y 8 (Schultheis 2015). Otros estudios han utilizado las mismas

categorías para valorar la intensidad de la tinción, con scores de intensidad de 0, 1, 2 y 3 (Ilie 2016).

La descripción del patrón de tinción es también variable según los autores. La tinción de las células tumorales en el CPNCP se describe por algunos como predominantemente de membrana, con presencia de un componente asociado de tinción citoplasmática de intensidad variable (Ilie 2016). En las células inflamatorias asociadas al tumor, el patrón de tinción varía según sus características morfológicas. Así, en el caso de células inflamatorias con citoplasmas amplios y límites celulares fácilmente discernibles como los macrófagos y las células dendríticas, la tinción se define como membranosa; en el caso de las células linfoides y debido a su escaso citoplasma la localización de la tinción es mucho más difícil de precisar, aunque se describe como citoplasmática y “en gota” (Herbst 2014, Ilie 2016).

En cuanto a la segunda cuestión, aún no se ha establecido de forma unívoca cuál debe ser el porcentaje mínimo de células que expresen PD-L1 que permitan clasificar una neoplasia como positiva, y por tanto seleccionar a los pacientes susceptibles de beneficiarse con fármacos inhibidores de PD-L1 (Kerr 2015, Sholl 2015). El porcentaje de células positivas utilizado como punto de corte oscila según el estudio entre valores $\geq 1\%$ (Borgahei 2015), $\geq 5\%$, $\geq 10\%$ y $\geq 50\%$ de las células neoplásicas (Dong 2002, Brahmer 2010, Herbst 2014, Garon 2015). Otros autores no fijan un porcentaje mínimo de células inmunorreactivas para considerar un caso como positivo (Ilie 2016). Los scores establecidos para los marcadores de PD-L1 desarrollados y validados en los ensayos clínicos publicados hasta la fecha se recogen en la Tabla 2. De hecho, cada uno de los test ha sido optimizado con arreglo a sus algoritmos de score específicos (Kerr 2015).

Uno de los principales problemas a la hora de establecer un score ha sido puesto de manifiesto tras los resultados del ensayo Keynote 001 (Garon 2015). Este estudio muestra que la relación entre la tasa de respuesta y el nivel de expresión puede no ser lineal, observándose que la mayor tasa de respuesta aparece en aquellos pacientes cuyos porcentajes de positividad para PD-L1 en el estudio inmunohistoquímico se sitúan suficientemente por encima del punto de corte establecido como positivo (Herbst 2014). Así, la positividad para PD-L1 en niveles $\geq 50\%$ de las células se correlaciona con un aumento de eficacia de pembrolizumab, con tasas de respuesta de hasta el 45,2% (Garon 2015). Las tasas de respuesta fueron superiores en fumadores (activos o exfumadores) que en no fumadores (22,5% frente al 10,3%) (Garon 2015). Esto hace suponer que en el grupo positivo para PD-L1 se han incluido pacientes que, por tener scores por encima pero muy próximos al punto de corte, no se beneficiarán del tratamiento; como consecuencia las diferencias entre este grupo y el negativo para PD-L1 decrecen, disminuyendo por tanto el valor predictivo del test. Por otra parte, y también en términos de probabilidad de respuesta al tratamiento, es plausible que aquellos pacientes cuyo resultado en el estudio inmunohistoquímico se sitúe inmediatamente por debajo del punto de corte sean diferentes a los que tienen tasas de positividad

inmediatamente por encima, y que sin embargo ambos puedan beneficiarse de la terapia en mayor medida que un paciente con total ausencia de expresión de PD-1/PD-L1 (Spira 2015). La consecuencia de ello sería que la tasa de respuesta se incrementaría en la cohorte negativa y disminuiría en el grupo positivo para dichos marcadores (Kerr 2015). En cuanto a la heterogeneidad tumoral, y aunque en principio no debería influir (puesto que se da tanto en los casos con resultado positivo para PD-L1 como en los negativos), dicha heterogeneidad podría llevar a la distribución incorrecta de los pacientes; este riesgo es mayor cuanto más bajo es el punto de corte (Kerr 2015). Por otra parte, y hasta la fecha, no hay datos que justifiquen el uso de scores diferentes a los propuestos en los ensayos clínicos publicados (Kerr 2015).

Las razones expuestas pueden llevar a una baja percepción de la utilidad del test de evaluación de PD-L1. A las previamente citadas hay que añadir que el propio funcionamiento biológico de la interacción PD-1-PD-L1 como mecanismo inmunorregulador hace que los tests de valoración inmunohistoquímica de dicha unión no tengan el poder predictivo de otros, como la detección de mutaciones de *EGFR* o de fusión de genes *ALK* (Kerr 2015). En este sentido, dado que se trata de un mecanismo complejo, pudiera suceder que la interacción PD-1/PD-L1 desencadenara algún efecto en células distintas a los linfocitos T, o bien que la interacción receptor-ligando produjera resultados diferentes en las distintas subpoblaciones de linfocitos T (Borczuk 2015).

4.4. Estudios comparativos de clones

Aún no se dispone de un estudio de comparación definitivo entre unos tests y otros. Dados los diferentes criterios de valoración en el patrón de tinción -membranoso, citoplasmático o ambos- y en el tipo de células consideradas en la evaluación -tumores, células inflamatorias asociadas al tumor o ambas- no es posible determinar a qué obedecen las diferencias en la proporción de células positivas para PD-L1. Estas diferencias podrían ser atribuidas a factores tan diversos como la especificidad del anticuerpo utilizado, la subjetividad en la interpretación del resultado, las diferencias biológicas inherentes a las distintas inmunoterapias empleadas, las características del tejido tumoral seleccionado e incluso a causas técnicas relacionadas con el procesamiento y conservación del tejido; así, algunos estudios utilizan muestras de tejido congelado, mientras que la mayoría usan tejido fijado en parafina, lo que puede influir notablemente en el resultado del estudio inmunohistoquímico (Mullard 2013, Teixidó 2015).

Existen algunos estudios comparativos de los distintos clones disponibles hasta la fecha. En uno de ellos se compararon los clones 5H1 y 28-8 valorando la tinción inmunohistoquímica en las células tumorales y en las células inmunitarias asociadas al tumor sobre tejido fijado en parafina (Topalian); si bien ambos mostraron una capacidad de unión a la región de membrana de PD-L1 muy similar (Cogswell 2013), el clon 28-8 demostró una mayor capacidad de detección de la proteína (porcentajes de células positivas

más altos). Otro estudio, realizado también sobre muestras fijadas en parafina de pacientes con melanoma reveló que de los 15 clones estudiados únicamente el anticuerpo 4059 era capaz de bloquear la unión a PD-L1 tras preincubación con una proteína de fusión PD-L1 y conseguir resultados libres de tinción de fondo (Gadiot 2011). En un estudio publicado más recientemente se compararon 7 anticuerpos sobre muestras en parafina de diferentes tipos de neoplasias, incluyendo las de origen pulmonar; ninguno de ellos demostró tener suficiente sensibilidad y/o especificidad para ser utilizados en test inmunohistoquímicos de detección de PD-L1 a excepción de los clones 22C3 y 20C3 (Pierce 2014, Tumeh 2014). En los escasos estudios en los que la intensidad de tinción es valorada, no se han observado diferencias significativas entre los clones utilizados (Schultheis 2015).

Es obvio suponer que la existencia de un único marcador inmunohistoquímico aplicable a cualquiera de los fármacos dirigidos frente a PD-L1 simplificaría notablemente la labor de patólogos y oncólogos, beneficiando por tanto al paciente (Kerr 2015). En este sentido, el denominado proyecto BLUEPRINT (US FDA 2015), en el que el comité de Patología de la International Association for the Study of Lung Cancer (IASCL) y 6 de los laboratorios implicados en el desarrollo de anticuerpos frente a PD-1/PD-L1 trabajan conjuntamente en la actualidad, supone el primer avance. En este estudio se valoran 4 clones de anticuerpo anti PD-L1 (22C3, 28-8, SP142, and SP263) sobre muestras de CPNCP, comparando su equivalencia técnica, pero no su potencial predictivo (Borczuk 2015). Actualmente, el National Comprehensive Cancer Network (NCCN), en colaboración con Bristol-Myers, está además realizando un estudio que valora la variabilidad entre los distintos ensayos, la heterogeneidad de expresión en una misma muestra tumoral y la concordancia entre patólogos a la hora de interpretar los resultados (NCCN 2015). En Francia, el Instituto Nacional del Cáncer está llevando a cabo un estudio de validación de PD-L1 de ámbito nacional en el que se evalúan diferentes anticuerpos y plataformas de tinción sobre tumores sólidos y hematológicos, incluyendo melanoma, cáncer de pulmón, mesotelioma, carcinomas de cabeza y cuello, y linfoma, con el objeto de proporcionar una guía de recomendaciones relativas a los protocolos, anticuerpos y sistemas de score (Sholl 2015). A la espera de resultados definitivos, parece lógico anticipar que se encontrarán diferencias sustanciales, en tanto en cuanto los test utilizan distintos procedimientos técnicos y distintos criterios de valoración de resultados (Kerr 2015). Por otra parte, y como resultado de la evaluación mediante técnicas inmunohistoquímicas de otros marcadores con valor pronóstico (como HER2 y receptores hormonales en el caso del cáncer de mama) es un hecho conocido que, incluso aplicando scores con criterios altamente estandarizados, si los test se realizan de manera excesivamente dispersa en múltiples laboratorios existirán discordancias sustanciales en los resultados (Sholl 2015). Estas discordancias se verán probablemente incrementadas por la diversidad de clones y de sistemas de detección inmunohistoquímica utilizados en los diferentes tests (Sholl 2015). La realización simultánea o sincrónica de varios tests sobre una misma muestra no parece a priori factible; a la restricción

lógica inherente a la cantidad de tejido disponible habría que añadir la necesidad de que cada laboratorio dispusiera de las distintas plataformas de inmunohistoquímica y de tinción asociadas a cada uno de los clones diseñados, así como del personal entrenado en la interpretación de los resultados. Estas limitaciones podrían acabar haciendo necesaria la centralización de las determinaciones de PD-L1 en un número reducido de laboratorios suficientemente equipados, con la consiguiente externalización de los casos (Kerr 2015). No obstante, teniendo en cuenta que muchos de ellos no podrían afrontar la externalización de un número sustancial de casos quizá haya que asumir la diversificación e introducir la reproducibilidad interlaboratorios como un elemento clave a la hora de garantizar la calidad de la prueba (Sholl 2015).

4.5. Tests LTD frente a test FDA

Las dificultades previamente expuestas han llevado a algunos laboratorios a desarrollar sus propios tests inmunohistoquímicos de detección de PD-L1 (tests desarrollados en laboratorio o LDTs) (Sholl 2015). Dichos tests pueden ser bien modificaciones parciales de alguno de los empleados en los ensayos clínicos validados hasta la fecha o bien el resultado de utilizar una plataforma de tinción o un clon completamente distintos. Los datos de comparación entre la fiabilidad de los LDTs frente a los clones desarrollados en los ensayos clínicos son aún escasos (Velcheti 2013, McLaughlin 2015). La valoración comparativa de dos de los clones más frecuentemente usados, el clon E1L3N (Cell Signaling Technology®) y el asociado a ensayo SP412 (Ventana®) ha revelado una escasa concordancia, con diferencias significativas de tinción (McLaughlin 2015); hay que tener en cuenta no obstante que dichos estudios comparativos se ven dificultados por 1) la utilización de técnicas de optimización de anticuerpos a veces obsoletas y 2) la falta de validación clínica de clones LDT, de los que se carece de datos relativos a respuesta al tratamiento que constituyan un gold-standard clínico bien definido (Sholl 2015, Borczuk 2015). Algunas instituciones pueden incluso por razones prácticas o económicas desarrollar LDTs propios para seleccionar pacientes candidatos al tratamiento con el/los agentes anti-PD-L1 de los que disponen; en estos casos puede ser necesaria la validación del resultado por parte del laboratorio comercial que disponga del test inmunohistoquímico específico para dicho agente, con la consiguiente demora en el inicio del tratamiento (Sholl 2015). Por estas razones, el uso de LDT como test con valor predictivo de respuesta al tratamiento inmunoterápico no está refrendado en la actualidad; parece además difícil justificar su utilización cuando se dispone de tests aprobados por la FDA (Borczuk 2015).

4.6. Elaboración del informe anatomopatológico de expresión de PD-1/PD-L1

El informe anatomopatológico de expresión de PD-L1 debería incluir qué test se ha utilizado, mencionando cuál es el punto de corte y especificando, en aquéllos que así lo requieren, si se ha evaluado el número mínimo de células necesario para la evaluación; en qué medida el resultado se sitúa por encima o

por debajo de dicho umbral, y los agentes terapéuticos asociados al test (Kerr 2015).

En relación al informe anatomopatológico es de gran importancia tener en cuenta el tipo de muestra utilizada en el estudio inmunohistoquímico. En los pacientes con carcinoma de pulmón, el tejido tumoral del que se dispone puede proceder de biopsias bronquiales obtenidas mediante fibrobroncoscopia, biopsias broncopulmonares percutáneas guiadas bajo control de tomografía computerizada, biopsias transbronquiales guiadas por ultrasonografía endobronquial (EBUS) y/o piezas quirúrgicas, ya sean de la masa tumoral primaria o de metástasis en ganglios locorreregionales o en órganos a distancia. Si bien todos los procedimientos citados son de gran utilidad y rentabilidad diagnóstica, las diferencias entre la cantidad de tejido tumoral disponible y por consiguiente de representación de áreas potencialmente distintas en la neoplasia han de ser tenidas en cuenta. Este hecho adquiere mayor relevancia si se considera que 1) una proporción significativa de pacientes con carcinoma de pulmón son inoperables en el momento del diagnóstico; y 2) en el caso del CPCP, el tratamiento muy raras veces es quirúrgico, por lo que únicamente se dispondrá del material de biopsia o de citología obtenido para diagnóstico (fig. 6). En estos pacientes, la necesidad de que los resultados de los estudios inmunohistoquímicos y moleculares destinados a diseñar la terapia adyuvante sean verdaderamente fiables se convierte en un hecho prioritario.

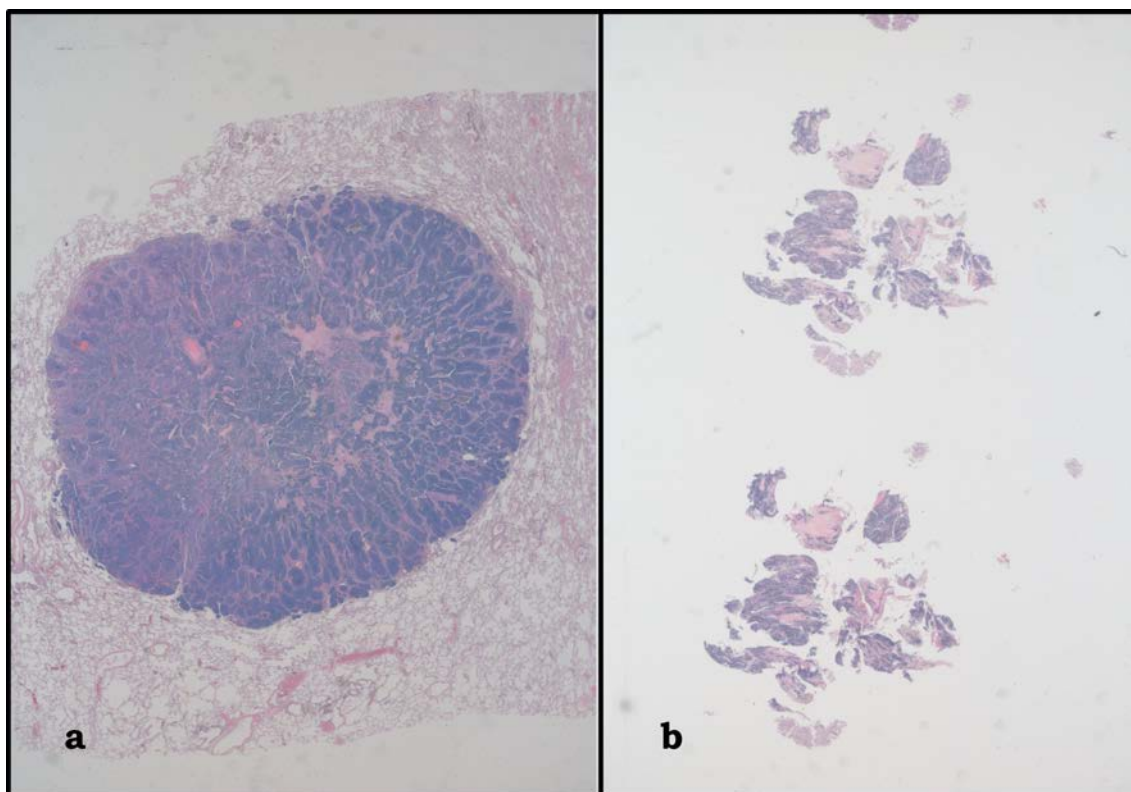


Fig.6. Comparación del tejido neoplásico presente en diferentes tipos de muestra de CPCP: a) Pieza quirúrgica; b) Biopsia transbronquial (BTB).

En este sentido se han realizado estudios en distintos tipos de neoplasias destinados a comparar la expresión de PD-L1 en muestras procedentes de biopsias diagnósticas frente a las correspondientes a piezas quirúrgicas en un mismo tumor (Taube 2012, Topalian 2012, Jilaveanu 2014, Velcheti 2014, Madore 2015, Ilie 2015, Kitazono 2015). La mayoría de ellos han encontrado diferencias significativas de expresión dependiendo del tipo de muestra utilizada, y por tanto un bajo nivel de concordancia en la valoración de PD-L1 entre el material de biopsia diagnóstica y las piezas quirúrgicas (Taube 2012, Topalian 2012, Jilaveanu 2014, Velcheti 2014, Madore 2015). Entre las causas que pueden explicar estas diferencias, la heterogeneidad tumoral es probablemente una de las más importantes (Velcheti 2014, Madore 2015). La presencia de diferencias morfológicas, inmunofenotípicas y genéticas entre unas zonas y otras de un mismo tumor es un hecho conocido; en el caso de la expresión de PD-L1, a estas diferencias hay que añadir el carácter dinámico de la respuesta inmune antitumoral, que lleva a que dichas diferencias sean no solo de localización (tanto en una única sección histológica como en diferentes secciones de un mismo tumor, y también entre el tejido del tumor primario y el de las metastásis en otro/s órgano/s) sino cambiantes en el tiempo (entendido ésto como los cambios experimentados por la neoplasia desde su origen como tumor primario hasta su progresión a carcinoma metastásico) (Taube 2014, Ilie 2016).

En el caso del CPNCP, algunos autores tampoco observaron una buena correlación entre los resultados de expresión inmunohistoquímica de PD-L1 (evaluada tanto en las células tumorales como en los TILs) entre ambos tipos de muestras. La tasa de discordancia global fue en algunos estudios del 48%, con valores del 19% para los casos en los que únicamente se valoró la expresión de PD-L1 en las células tumorales y del 20% para los casos en los que se valoró la expresión de dicho marcador tanto en las células tumorales como en las células inmunes (Ilie 2016). No se observaron diferencias significativas en las tasas de discrepancia dependiendo del subtipo histológico (AC *versus* CE) (Ilie 2016). Otros autores sin embargo obtuvieron tasas de concordancia entre ambos tipos de especímenes del 92% (Kitazono 2015). Las diferencias de resultados pueden deberse, además de las previamente citadas, a causas técnicas y/o de procedimiento: 1) la utilización de distintos clones de PD-L1 en unos trabajos y otros; 2) el diferente procedimiento de valoración de las muestras (secciones histológicas completas frente a varios campos de gran aumento seleccionados de forma aleatoria). En todos los casos evaluados en los que se observó discrepancia de resultados entre biopsia y pieza quirúrgica, la biopsia infraestimaba la expresión de PD-L1; no se observaron casos en los que la biopsia diagnóstica detectó inmunorreactividad para PD-L1 no observada posteriormente en la pieza (Ilie 2016). En cuanto a la localización de la tinción, del total de casos en los que se detectó expresión de PD-L1 en la pieza pero no en la biopsia, un 75% estaba presente únicamente en el componente celular de los TILs; en el 25% restante la positividad se observó tanto en las células tumorales como en los TILs (Ilie 2016). No se observaron diferencias significativas de expresión de PD-L1 dependiendo del

procedimiento de obtención de la toma biopsica (percutánea, bronquial o transbronquial) (Ilie 2016).

Algunos autores han demostrado que existen diferencias significativas entre casos concordantes frente los no concordantes en el número medio de biopsias bronquiales valoradas; esto les ha llevado a proponer la valoración inmunohistoquímica de expresión de PD-L1 sobre un número mínimo de 6 biopsias bronquiales obtenidas preferiblemente de diferentes áreas del tumor (Ilie 2016).

5. Métodos alternativos de valoración del status PD-1/PD-L1

Aunque la recomendación actual es valorar la expresión de PD-L1 sobre tejido tumoral fijado en parafina, se han propuesto fuentes alternativas de análisis. Recientemente se han publicado trabajos sobre la determinación en sangre de biomarcadores en pacientes con CPNCP (Teixidó 2014, Karachaliou 2015). Los estudios en este sentido se dirigen pues en la actualidad a la búsqueda de tests no invasivos en muestras sanguíneas que incluirían la determinación de PD-L1 en células tumorales circulantes (CTC) y en el plasma (Pailler 2013, Thierry 2014). En un ensayo clínico en fase III en pacientes con linfoma B difuso de célula grande se demostró que la presencia de proteína PD-L1 en sangre se asociaba a un peor pronóstico en pacientes seleccionados aleatoriamente del brazo R-CHOP (Rosille 2014).

Algunos estudios en los que la evaluación de PD-1/PD-L1 se ha realizado mediante técnicas de cuantificación de expresión génica basadas en mRNA han mostrado resultados superiores en cuanto a sensibilidad respecto a los tests inmunohistoquímicos, con porcentajes de detección del 35,7% frente al 18,5% (Schultheis 2015). Una posible explicación a este hecho es que en los estudios de expresión génica se utilizan volúmenes mayores de tejido tumoral de partida; adicionalmente y debido al carácter heterogéneo de los tumores, también en relación a la distribución de los TILs (que frecuentemente es parcheada, y variable de unas zonas a otras), las secciones histológicas destinadas al estudio inmunohistoquímico de PD-1/PD-L1, especialmente si proceden de tissue arrays de parafina, ven limitada su representatividad.

6. Patrones de expresión de PD-1/PD-L1 en las neoplasias

Varios estudios han descrito la asociación entre la expresión de PD-L1 y diversos factores clínico-patológicos en el carcinoma de pulmón (Yang 2014, Velcheti 2014). Si bien en algunos la expresión de PD-L1 se correlaciona con un mayor grado de diferenciación tumoral, en otros tal asociación no se ha demostrado (Yang 2014, Chen YB 2012).

En cuanto a la asociación entre la expresión de PD-L1 y el pronóstico los resultados son contradictorios. Mientras que algunos estudios han

demostrado la existencia de una asociación significativa entre la expresión de dicho marcador y un mejor pronóstico en pacientes con CPNCP, carcinoma colorrectal, carcinoma de mama y melanoma maligno (Droeser 2013, Schalper 2014, Hino 2010, Lipson 2013, Yang 2014, Velcheti 2014), otros autores han observado asociación con un peor pronóstico en pacientes con CPNCP, hepatocarcinoma y carcinoma de páncreas, esófago, estómago, ovario y riñón (Thompson 2004, Thompson 2005, Thompson 2006, Ohigashi 2005, Wu 2006, Nomi 2007, Thompson 2007, Hamanishi 2007, Parsa 2007, Gao 2009, Chen 2012, Jiang 2013). Estos resultados contradictorios pueden obedecer a problemas relacionados con la valoración mediante técnicas inmunohistoquímicas de la expresión de PD-L1 en las muestras tumorales, como son: 1) los estudios no emplean el mismo anticuerpo anti-PD-L1; 2) no existe aún un punto de corte definido como criterio porcentual de positividad universalmente aceptado; y 3) la reproducibilidad de los resultados aún no ha sido adecuadamente evaluada. Para futuras aplicaciones clínicas aún son necesarios pues estudios adicionales destinados a estandarizar pruebas cuantitativas de expresión de PD-L1 (Ishii 2015).

7. PD-L1 en el carcinoma de pulmón de células pequeñas

La expresión de PD-L1 en el CPCP aún no es bien conocida, y los estudios realizados hasta la fecha ofrecen resultados dispares. En los escasos trabajos publicados los resultados son contradictorios; mientras que algunos han observado expresión de PD-L1 en el CPCP superior al descrito en el CPNCP (Yang 2014, Velcheti 2014, Ishii 2015) en otros la proporción es inferior (Schultheis 2016).

Ishii *et al* observó positividad para PD-L1 en un 71,6% de los casos; se valoró como positiva la tinción membranosa, citoplasmática o ambas tanto en células tumorales como en las células inmunes asociadas al tumor (Ishii 2015). Dicha expresión era significativamente mayor en pacientes con enfermedad localizada (EL) que en aquéllos con enfermedad extensa (EE) (Ishii 2015). No se observó correlación entre la expresión de PD-L1 y la edad, el sexo ni los niveles séricos de LDH, pro-GPR y NSE (Ishii 2015). En el análisis univariante, la supervivencia global (definida como el periodo entre el momento inicial del diagnóstico y/o la fecha de inicio de tratamiento y la fecha de fallecimiento y/o de último seguimiento) fue superior en pacientes con EL, con un mejor estado general (performance status), con niveles séricos normales de LDH y con niveles séricos bajos de enolasa específica neuronal (NSE) (Ishii 2015). En este mismo análisis, la supervivencia global fue significativamente mayor en los pacientes PD-L1 positivos que en los negativos, si bien únicamente en el subgrupo de pacientes con EE; no se observaron diferencias significativas de supervivencia entre pacientes PD-L1 positivos y negativos en el subgrupo con EL (Ishii 2015). Tampoco se demostraron diferencias significativas en la supervivencia libre de progresión (PFS, definido como el tiempo entre el inicio del tratamiento de primera línea y la fecha en la que se produce progresión de

la enfermedad o la muerte por cualquier causa) entre pacientes PD-L1 positivos y negativos, ni en los pacientes con EL ni en aquéllos con EE (Ishii 2015). En el análisis multivariante, la expresión de PD-L1 resultó ser un factor independiente con valor predictivo de supervivencia (Ishii 2015). Otras variables que resultaron ser factores independientes con valor predictivo de supervivencia fueron el estadio EL y el periodo libre de enfermedad más prolongado (Ishii 2015). Este estudio es, pues, el primero en demostrar una asociación significativa entre la expresión de PD-L1 y un mejor pronóstico en el CPCP; sugiere además que PD-L1 es probablemente más un factor con valor pronóstico que un factor predictivo de respuesta a la quimioterapia (Ishii 2015).

Al igual que sucede con otros tipos de neoplasias, aún no existen scores uniformes de valoración de la positividad para PD-L1. Algunos estudios consideran negativos porcentajes inferiores al 5% (Brahmer 2010, Taube 2012) o bien al 20% (Schultheis 2015).

8. PD-1 y PD-L1 en el microambiente inmunológico de las neoplasias

La importancia del microambiente inmunológico en las neoplasias es bien conocida. Algunos estudios han observado positividad para PD-1/PD-L1 únicamente en los TILs, ya sea en las localizadas en el estroma peritumoral, en la interfase estroma-tumor o en el interior de los nidos neoplásicos. En el CPCP se ha descrito que la expresión de PD-1, observada en un 48% de los pacientes, aparece mayoritariamente en los linfocitos T CD3+ localizados en la interfase estroma-tumor; esta expresión, de intensidad moderada (score 2), se observó también aunque en proporción muy inferior en algunos casos en los linfocitos intratumorales (Schultheis 2015). La expresión de PD-L1, de intensidad leve a moderada (score 1-2) y presente en un 18.5% de los casos, se observó en células inflamatorias de la interfase estroma-tumor que resultaron ser mayoritariamente macrófagos CD68 positivos (TAMs). La correlación global PD-L1+TAMs y PD-1+TILs fue de 0,35, con un rango de entre 0,21 y 0,56 según se tratara de un tumor primario o una metástasis, respectivamente (Schultheis 2015). Este dato demuestra que la mayoría de los casos de CPCP PD-L1+ en los TILs son metástasis; ello sugeriría que el proceso de diseminación metastásica lleva asociado un “enriquecimiento” celular para dicho antígeno (Schultheis 2015).

En un estudio realizado sobre 5 tipos de tumores sólidos se ha descrito que existe una asociación “geográfica” entre la expresión de PD-L1 en las células tumorales y los TILs PD-1+; este mismo estudio demuestra que la positividad para cualquiera de ambos marcadores tiene valor predictivo de respuesta a las terapias anti-PD-L1 (Taube 2014).

Fármaco	Empresa	Ensayo	Diseño del estudio	Línea de tratamiento	Dictamen FDA	Tipo histológico tumoral	Uso
Nivolumab (Opdivo)	Bristol-Myers Squibb (New York, NY)				Aprobado para CPNCP escamoso y no escamoso	Escamoso y no escamoso	Complementario
Nivolumab (CheckMate 063)	Bristol-Myers Squibb (New York, NY)		Fase 2 (single arm)	Tercera o superior		Escamoso	Complementario
Nivolumab (CheckMate 017)	Bristol-Myers Squibb (New York, NY)		Fase 3	Segunda (en progresión durante o después de QT con platino)		Escamoso	Complementario
Nivolumab (CheckMate 057)	Bristol-Myers Squibb (New York, NY)	NCT01673867	Fase 3	Segunda (tras fracaso de QT con platino)		No escamoso	Complementario
Pembrolizumab (Keytruda)	Merck (Kenilworth, New Jersey)	KEYNOTE-001	Fase 1	Primera o superior	Aprobado para CPNCP EGFR-, ALK- en progresión durante o después de QT con platino	CPNCP	Acompañante
Atezolizumab (MPDL3280A)	Roche (Basel, Switzerland)	POPLAR	Fase 2	Segunda o tercera	Esperado en 2016	CPNCP	En desarrollo
Durvalumab (MEDI4736)	Astra-Zeneca (London UK)	MEDI4736	Fase 1	Cualquiera	Esperado en 2016	CPNCP	En desarrollo
Avelumab (JAVELIN)		JAVELIN	Fase 1	Segunda o superior		CPNCP	
Gefitinib/erlotinib (D'Incecco)							

Tabla 1. Fármacos anti-PD-L1: ensayos clínicos, tipo histológico y dictamen FDA tinción (modificada de Kerr 2015, Sholl 2015, Teixidó 2015).

Fármaco	Anticuerpo	Empresa anticuerpo	Plataforma inmunohistoquímica	Empresa plataforma	Score
Nivolumab (Opdivo)	28-8	Dako	Dako pharmDx Link 48 Autostainer	Dako, Carpenteria, California	≥1% de las células tumorales
Nivolumab (CheckMate 063)	28-8	Dako	Dako pharmDx Link 48 Autostainer	Dako, Carpenteria, California	≥1% de las células tumorales
Nivolumab (CheckMate 017)	28-8	Dako	Dako pharmDx Link 48 Autostainer	Dako, Carpenteria, California	≥1% de las células tumorales
Nivolumab (CheckMate 057)	28-8	Dako	Dako pharmDx Link 48 Autostainer	Dako, Carpenteria, California	≥1% de las células tumorales
Pembrolizumab (Keytruda)	22C3	Dako	Dako pharmDx Link 48 Autostainer	Dako, Carpenteria, California	≥50% de las células tumorales
Atezolizumab (MPDL3280)	SP142	Spring Biosciences Genentech, South San Francisco, California	Plataforma automatizada Ventana	Ventana (Tucson, Arizona)	≥5% en células tumorales y/o células inmunes asociadas al tumor (TILs)
Durvalumab (MEDI4736)	SP263	Spring Biosciences Genentech, South San Francisco, California	Plataforma automatizada Ventana	Ventana (Tucson, Arizona)	≥25% de las células tumorales
Avelumab (JAVELIN)	Dato no disponible		Plataforma Dako no especificada	Dako, Carpenteria, California	Dato no disponible
Gefitinib/erlotinib					

Tabla 2. Anticuerpos anti-PD-L1: scores de tinción (modificado de Kerr 2015, Sholl 2015, Teixidó 2015).

Anticuerpo	Región diana de la molécula	Patrón de tinción	Tipo celular evaluado	Umbral de positividad	Empresa
28-8	Dominio extracelular	Citoplasmático	Tumorales	≥5%	Bristol-Myers Squibb (New York, NY)
22C3	Dominio extracelular		Tumorales	≥50%	Merk (Whitehouse Station, NJ)
20C3					Merk (Whitehouse Station, NJ)
SP142	Dominio intracelular	Membranoso y/o citoplasmático	Tumorales Células del sistema inmune	≥5%	Roche (Basel, Switzerland)
SP263	Dominio extracelular				Roche (Basel, Switzerland)
5H1		Membranoso	Tumorales Células del sistema inmune	≥5% ≥10%	L Chen, Johns Hopkins University (Baltimore, MD)
58810			Tumorales	≥5%	
24B10.G6.D7					Medarex, Princeton, NJ
25C8E8.F8					Medarex, Princeton, NJ
1105					Medarex, Princeton, NJ
ETM-79					Medarex, Princeton, NJ
ETM-80					Medarex, Princeton, NJ
6H3					Medarex, Princeton, NJ
16A4					Medarex, Princeton, NJ
9A6					Medarex, Princeton, NJ
16E11					Medarex, Princeton, NJ
27A2			Tumorales	Intensidad de tinción moderada	MBL International, Wobum, MA
2-272					O. Majdic, University of Vienna Medical School, Vienna
5-496					O. Majdic, University of Vienna Medical School, Vienna
4059					ProSci/Sigma, Poway, CA
MIH1			Tumorales	≥1%	eBioscience, San Diego, CA
22					US Biological, Salem MA
22E					US Biological, Salem MA
AF-156					R&D Systems, Minneapolis, MN

Tabla 3. Anticuerpos anti-PD-L1: patrón de tinción, diana celular y scores de tinción (modificada de Teixidó et al 2015).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

A la vista de las particularidades en cuanto a comportamiento biológico y características morfológicas del CPCP, la hipótesis de trabajo fue la probable existencia de diferencias entre la expresión de PD-L1 en las células tumorales y en los TILs de este tipo de neoplasia frente a otros subtipos histológicos de carcinoma de pulmón, en los que dicho biomarcador ha sido más ampliamente estudiado. La confirmación y el conocimiento de estas diferencias podrían ser de utilidad para determinar si los scores empleados en la valoración de PD-L1 para el CPNCP son aplicables y/o reproducibles en el CPCP, o bien necesitarían ser redefinidos para este tipo de neoplasia, y también para facilitar la interpretación de los resultados una vez identificados patrones de tinción específicos. Además, la valoración de la posible asociación de las distintas características de la expresión de PD-L1 en las células tumorales y en los TILs con variables clínicas, de lo que se dispone de pocos datos hasta la fecha, permitiría potencialmente la identificación y selección de los pacientes en los que el uso de terapias basadas en el restablecimiento del sistema inmune tendrían un mayor beneficio.

En base a los conocimientos actuales sobre PD-L1 y a la hipótesis mencionada, los objetivos de este estudio fueron:

1. Analizar la expresión inmunohistoquímica de PD-L1 en el CPCP, tanto en las células tumorales como en los infiltrados inflamatorios asociados al tumor (TILs), incluyendo la valoración en ambos tipos celulares del porcentaje global de expresión de dicho marcador, la intensidad de tinción, el patrón de tinción intracelular y la localización de las células PD-L1+ en los distintos componentes del tumor (estroma y nidos epiteliales neoplásicos) según los patrones definidos en el estudio y, en relación a los TILs PD-L1+, las diferencias en su composición celular.
2. Evaluar el microambiente inmune asociado al CPCP, valorando tanto su cuantía global como la composición celular en el componente estromal y en los nidos tumorales.
3. Correlacionar las distintas características de la expresión de PD-L1 en las células tumorales con respecto a las observadas en los TILs y ambas en relación a las variables clínico-patológicas de la serie.
4. Comparar los resultados obtenidos con los datos existentes hasta la fecha sobre la expresión de PD-L1 en el CPCP.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Criterios de selección de las muestras

Para el estudio se seleccionó un total de 88 pacientes diagnosticados de carcinoma de pulmón de células pequeñas (CPCP) en el Hospital Universitario HM Sanchinarro, sobre material de biopsia y/o pieza quirúrgica y con arreglo a las recomendaciones en uso (Travis 2012), tanto en estadios localizados (EL) como en estadios extendidos (EE) entre los años 2008 y 2015. Los procedimientos implicados en este proyecto se ajustan a la normativa ética del Grupo HM Hospitales.

El examen inicial incluyó la evaluación morfológica de la neoplasia teñida con hematoxilina-eosina (H&E) y la valoración del resultado de las tinciones inmunohistoquímicas realizadas al diagnóstico con los marcadores de diferenciación neuroendocrina cromogranina A, sinaptofisina y CD56. Este examen permitió, además de la confirmación del diagnóstico previo, la selección de los bloques de parafina más adecuados para la realización posterior de técnicas complementarias.

De los 90 pacientes inicialmente seleccionados, 2 fueron excluidos del estudio por no disponer, en sus muestras parafinadas, de suficiente celularidad neoplásica para la realización de las técnicas adicionales (en un caso la muestra correspondía al tumor primario y en el otro caso a una metástasis ósea). El número total de muestras tumorales estudiadas ha sido de 90, ya que en 2 de los 88 pacientes incluidos se disponía tanto de la muestra de tumor primario como de la metástasis ganglionar.

Las muestras tumorales procedían del tumor pulmonar primario en 83 casos y de metástasis en 7 casos. El tejido tumoral procedente del tumor primario se obtuvo de material de biopsia transbronquial en 80 casos y de piezas quirúrgicas en 3 casos. El órgano de procedencia en los casos de metástasis fue hígado (2 casos), hueso (2 casos), cerebelo (1 caso) y ganglios linfáticos regionales (2 casos).

Los siguientes datos clínicos y de laboratorio se recogieron al diagnóstico por el Servicio de Oncología Médica del mismo centro:

-Fecha de nacimiento.

-Sexo.

-Hábito tabáquico, que incluía las opciones: a) nunca fumador y b) fumador activo en el momento del diagnóstico.

-Estado general o performance status (PS): se estableció, según la clasificación vigente del Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) en categorías PS 0, 1, 2, 3 y 4.

-Fecha de diagnóstico inicial: con este dato y la fecha de nacimiento se obtuvo la edad al momento del diagnóstico.

-Localización anatómica de la neoplasia en el momento del diagnóstico: el/los órganos en los que se evidenció presencia de neoplasia con criterios radiológicos y/o anatomopatológicos.

-Tamaño del tumor primario pulmonar al diagnóstico (en milímetros).

-Estadio clínico al diagnóstico: se incluyeron las opciones enfermedad localizada (EL) *versus* enfermedad extensa (EE), según los criterios de estadificación vigentes (ver introducción).

-Estadio TNM, determinado según la clasificación vigente que consta en International Union Against Cancer (UICC): TNM Classification of Malignant Tumours, 7^a ed., L.H. Sobin, Ch. Wittekind (eds.) Wiley, New York. Con arreglo a las últimas especificaciones, el estadio M1 se subdividió en las siguientes categorías:

*M1a: en esta categoría se incluyen los casos con nódulos tumorales en el pulmón contralateral y/o la presencia de derrame pleural y/o pericárdico.

*M1b: metástasis a distancia 8se excluyen las circunstancias del apartado previo).

-Tratamiento quimioterápico administrado: se incluyó tanto el tipo de fármaco o combinación de fármacos como el número total de ciclos administrados.

-Fecha de finalización del tratamiento quimioterápico.

-Tratamiento radioterápico: se consignaron, en los casos en que fue administrada radioterapia, la modalidad y los campos anatómicos de aplicación.

-Recaída tumoral: definida como la reaparición de focos de tejido tumoral en cualquier localización tras aparente remisión clínico-radiológica de la enfermedad. En los pacientes en estadio IV la demostración de neoplasia en localizaciones no detectadas en el momento del diagnóstico fue reseñada como progresión y no como recaída tumoral.

-Localización anatómica de la recaída tumoral: el/los órganos en los que se evidenció presencia de neoplasia con criterios radiológicos y/o anatomopatológicos tras un periodo de remisión de la enfermedad.

-Fecha de la recaída tumoral.

-Intervalo libre de enfermedad en días y en meses.

-Fecha del último seguimiento.

-Estado del paciente en la fecha del último seguimiento: se incluyeron las categorías exitus por enfermedad /vivo sin enfermedad / vivo con enfermedad.

-Supervivencia global: tiempo transcurrido hasta el último evento disponible del paciente en meses y en días.

II. Técnicas inmunohistoquímicas

En el laboratorio de microtomía se obtuvieron, de cada uno de los bloques de parafina que incluyen las muestras tumorales, 5 secciones histológicas de 3 micras de grosor que se recogieron sobre portaobjetos tratados (cargados electrostáticamente). La primera sección se destinó al estudio inmunohistoquímico de la expresión de PD-L1 utilizando el anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 clon E1L3N™ XP® (Rabbit Monoclonal Antibody; Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA).

El siguiente paso fue la determinación del microambiente tumoral, estudiando las células inmunes (TILs) mediante los marcadores inmunohistoquímicos CD3 (linfocitos T), CD8 (linfocitos T citotóxicos), CD20 (linfocitos B) y CD68 (macrófagos). Las 4 secciones restantes se utilizaron para el estudio inmunohistoquímico de la expresión de CD8 (anticuerpo monoclonal CONFIRM™ anti-CD8 clon SP57 [Rabbit Monoclonal Antibody; Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA]), CD3 (anticuerpo monoclonal CONFIRM™ anti-CD3 clon 2GV6 [Rabbit Monoclonal Antibody; Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA]), CD20 (anticuerpo monoclonal CONFIRM™ anti-CD20 clon L26 [Mouse Monoclonal Antibody; Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA]) y CD68 (anticuerpo monoclonal CONFIRM™ anti CD68 clon KP-1 [Mouse Monoclonal Antibody; Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA]).

Todas las determinaciones inmunohistoquímicas se realizaron en la plataforma automatizada BenchMark ULTRA (Ventana Medical System Inc., Tucson, AZ, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante, utilizando protocolos optimizados e incluyendo controles positivos para cada uno de los marcadores a estudio. A continuación se detallan las condiciones empleadas:

- Desenmascaramiento CC1 estándar durante 64 minutos a 95 grados.
- Dilución anticuerpo: 1:200.
- Incubación anticuerpo primario: 44 minutos.
- El sistema de detección empleado fue *OptView DAB IHC Detection Kit* (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA).
- Contraintinción con *Hematoxylin I* durante 8 minutos seguido de *Bluing Reagent* durante 4 minutos.

Tras una valoración preliminar al microscopio óptico de los primeros 20 casos se decidió, a la vista del escaso material disponible en los bloques de parafina, no continuar con la realización de tinciones inmunohistoquímicas para CD3, CD20 y CD68, restringiéndola a la determinación de los dos marcadores imprescindibles para la valoración de la hipótesis de trabajo (PD-L1 y CD8). Esta decisión se basó en las siguientes observaciones: 1) la posibilidad de identificar la presencia individual y porcentual de macrófagos en los infiltrados mediante microscopía óptica por sus características morfológicas, sin

necesidad de utilizar técnicas inmunohistoquímicas; 2) la escasa participación de linfocitos B CD20+ en los infiltrados linfoides asociados al tumor; según las observaciones preliminares estas células estaban presentes de forma habitual en los infiltrados subepiteliales del bronquio nativo (tejido linfoide asociado a mucosas) pero eran muy escasos o inexistentes en los TILs y 3) a la vista de los datos recogidos en los trabajos recientemente publicados para otras variantes histológicas de carcinoma de pulmón, la decisión de priorizar la valoración de la presencia porcentual de los linfocitos T CD8+ sobre el total de células inflamatorias asociadas al tumor frente a su significación sobre el total de linfocitos T CD3+ en dichos infiltrados.

III. Valoración manual de la expresión de PD-L1

La expresión inmunohistoquímica de PD-L1 se evaluó tanto en las células tumorales como en los TILs. Todas las muestras se revisaron inicialmente a bajo aumento; a continuación, utilizando un aumento 20x, se seleccionaron las áreas a valorar, registrando los siguientes parámetros:

1. En las células tumorales

-Intensidad de tinción PD-L1: se clasificó bajo los epígrafes ausencia de tinción, tinción débil y tinción intensa, las dos últimas en virtud del aumento necesario para detectarla. Así, se consideró débil la tinción detectada únicamente con aumentos superiores a 20x y tinción intensa a la positividad observada con aumentos iguales o inferiores a 20x.

-Patrón de tinción intracelular PD-L1: se valoró la presencia de tinción membranosa, citoplasmática o la coexistencia de ambas, así como la tendencia al predominio de una localización intracelular sobre otra. En virtud de dicha localización se definieron los siguientes patrones:

*Patrón “ausencia de tinción”.

*Patrón de tinción “membrana=citoplasma”, es decir, similar grado de tinción en la membrana y en el citoplasma.

*Patrón de tinción “citoplasma>membrana”, es decir, mayor grado de tinción del citoplasma que de la membrana celular.

-Localización de las células tumorales PD-L1+ en el interior de los nidos neoplásicos: se valoraron las diferencias de distribución de las células tumorales que expresaban dicho marcador en el interior de los nidos neoplásicos, esto es, la tendencia a localizarse en las zonas centrales de los nidos, en el área periférica o en ambas. así como el posible predominio de una localización sobre otra. En virtud de lo observado se definieron los siguientes patrones:

*Patrón “ausencia de tinción”, definido por la ausencia de expresión de PD-L1 en las células tumorales, en cualquier localización;

*Patrón de localización “periferia=centro de los nidos tumorales”, es decir, presencia de células tumorales PD-L1+ en número similar en las zonas centrales y en la zona periférica de los agregados epiteliales neoplásicos;

*Patrón de localización “periferia>centro de los nidos tumorales”, es decir mayor número de células tumorales PD-L1+ en la zona periférica que en las áreas centrales de los nidos neoplásicos;

*Patrón de localización “periferia de los nidos tumorales”: es decir, identificación de células tumorales PD-L1+ únicamente en la zona periférica de los nidos neoplásicos.

No se encontraron casos en los que la localización de las células neoplásicas PD-L1 positivas se observara exclusivamente en el centro de los nidos tumorales, por lo que no se incluyó el patrón “centro de los nidos tumorales”.

-Porcentaje de células tumorales PD-L1+: el porcentaje fue estimado sobre el total de células neoplásicas presentes en el área examinada. Con el objeto de no excluir del análisis estadístico la expresión inmunohistoquímica porcentual inferior al 1%, y a fin de valorar su significación en el CPCP, en los casos en los que se observó positividad en células aisladas el porcentaje se cuantificó como “0,1%”. Estos casos se agruparon además en una categoría denominada “células tumorales PD-L1+ aisladas”.

2. En los TILs

-Intensidad de tinción PD-L1: se clasificó en intensa, media y débil en virtud del aumento necesario para detectarla. Así, se consideró intensa la positividad observada con aumentos inferiores a 20x; media, la tinción detectada con aumentos a partir de 20x; y débil, la tinción detectada únicamente con aumentos superiores o iguales a 40x.

-Patrón de tinción intracelular PD-L1: se valoró la presencia de tinción membranosa, citoplasmática o la coexistencia de ambas, así como la tendencia al predominio de una localización intracelular sobre otra. En virtud de dicha localización se definieron los siguientes patrones:

*Patrón “ausencia de tinción”.

*Patrón de tinción “membrana=citoplasma”, es decir, similar grado de tinción en la membrana y en el citoplasma;

*Patrón de tinción “membrana>citoplasma”, es decir, mayor grado de tinción membranosa que citoplasmática;

*Patrón de tinción “citoplasma>membrana”, es decir, mayor grado de tinción del citoplasma que de la membrana celular.

-Porcentaje de células inflamatorias PD-L1+: valorado sobre el total de células inflamatorias en el área examinada. Con el objeto de no excluir del análisis estadístico la expresión inmunohistoquímica porcentual inferior al 1%, y a fin

de valorar su significación en el carcinoma de células pequeñas, en los casos en los que se observó positividad en células aisladas el porcentaje se cuantificó como “0,1%”. Estos casos se agruparon además en una categoría denominada “células inflamatorias PD-L1+ aisladas”.

-Tipo de células inflamatorias PD-L1+: a la vista de la posibilidad de diferenciar por sus características morfológicas a los linfocitos de los macrófagos, se valoró el tipo o tipos celulares a los que correspondían las células PD-L1+ en los infiltrados inflamatorios asociados al tumor, así como el posible predominio de uno sobre otro. En virtud de los hallazgos se definieron las siguientes categorías:

*Patrón “macrófagos=linfocitos”, cuando las células inflamatorias PD-L1+ de los infiltrados inflamatorios asociados al tumor eran macrófagos y linfocitos en proporciones similares;

*Patrón “macrófagos>linfocitos”, cuando entre las células inflamatorias PD-L1+ de los infiltrados inflamatorios asociados al tumor predominaban los macrófagos sobre los linfocitos;

*Patrón “macrófagos<linfocitos”, cuando entre las células inflamatorias PD-L1+ de los infiltrados inflamatorios asociados al tumor los linfocitos predominaban sobre los macrófagos.

-Localización y distribución de los TILs PD-L1+ en los distintos componentes del tumor: se valoró la presencia o ausencia de dichas células en el estroma y en el interior de los nidos epiteliales tumorales. Con respecto a la localización en el interior de los agregados epiteliales neoplásicos, y de forma análoga a lo realizado en las células tumorales PD-L1+, se valoró si los TILs PD-L1+ se situaban en la periferia de los nidos, en el centro o en ambas áreas, y se valoró el posible predominio de una localización sobre otra. En relación al estroma, y a fin de determinar la posible existencia de diferencias en la implicación de las células inflamatorias según su localización más o menos distante al tumor, se definieron las siguientes áreas:

*La “interfase estroma/tumor”, entendida como el estroma yuxtatumoral, es decir el inmediatamente adyacente o circundante a los nidos neoplásicos;

*El “estroma peritumoral”, es decir, el situado a cierta distancia de las células neoplásicas, entre unos nidos epiteliales y otros.

A la vista de las diferencias en la distribución de los TILs PD-L1+ en las distintas áreas del tejido tumoral, se definieron las siguientes categorías, en virtud de la proporción de células positivas para dicho marcador en el componente estromal y en los nidos neoplásicos (y dentro de cada uno de ellos en las diferentes zonas previamente descritas), en orden decreciente cuando procediera:

*Patrón “ausencia de TILs PD-L1+”, en cualquier localización;

*Patrón de localización “interfase estroma/tumor>estroma peritumoral>intratumorales”: este patrón incluía los casos en los que los TILs PD-L1+ estaban presentes, en proporción decreciente, en el estroma localizado inmediatamente adyacente a los nidos tumorales (“interfase estroma/tumor”), en el estroma situado a cierta distancia de éstos entre unos agregados neoplásicos y otros (“estroma peritumoral”) y en el interior de los nidos neoplásicos (con similar distribución en éstos últimos en el centro y en la periferia);

*Patrón de localización “estroma peritumoral>interfase estroma/tumor”: este patrón incluía los casos en los que los TILs PD-L1+ estaban presentes de forma exclusiva en el estroma (sin presencia acompañante de células positivas para dicho marcador en el interior de los nidos epiteliales neoplásicos), en proporción decreciente en el estroma situado a cierta distancia de éstos, entre unos agregados neoplásicos y otros (“estroma peritumoral”) y en el estroma localizado inmediatamente adyacente a los nidos tumorales (“interfase estroma/tumor”);

*Patrón de localización “interfase estroma/tumor>estroma peritumoral”: este patrón incluía los casos en los que los TILs PD-L1+ estaban presentes de forma exclusiva en el estroma (sin presencia acompañante de células positivas para dicho marcador en el interior de los nidos epiteliales neoplásicos), en proporción decreciente en el estroma localizado inmediatamente adyacente a los nidos tumorales (“interfase estroma/tumor”) y en el estroma situado a cierta distancia de éstos, entre unos agregados neoplásicos y otros (“estroma peritumoral”);

*Patrón de localización “interfase estroma/tumor>intratumorales (periferia de los nidos neoplásicos)”: este patrón incluía los casos en los que los TILs PD-L1+ estaban presentes, en proporción decreciente, tanto en el estroma (si bien de forma exclusiva en el localizado inmediatamente adyacente a los nidos tumorales, esto es, la “interfase estroma/tumor”) como en el interior de los nidos neoplásicos; en éstos los TILs PD-L1+ se localizaban mayoritariamente en la zona periférica;

*Patrón de localización “intratumorales”: este patrón incluía los casos en los que los TILs PD-L1+ estaban presentes de forma exclusiva en el interior de los nidos neoplásicos (sin presencia de células inflamatorias positivas para dicho marcador en el estroma), ya fuera en el centro de los agregados epiteliales neoplásicos, en la zona periférica o en ambas.

Partiendo de la observación de que con cierta frecuencia los macrófagos intraalveolares del tejido pulmonar no infiltrado de las muestras mostraban expresión inmunohistoquímica de PD-L1, y a fin de tratar de determinar su grado de relevancia en la respuesta inmune asociada al tumor, se incluyó en este apartado la denominación “macrófagos intraalveolares yuxtatumorales” para describir la presencia de macrófagos PD-L1+ en las luces del tejido pulmonar nativo adyacente a la neoplasia. No obstante, y con el fin de no

perder potencia estadística por excesiva subcategorización, la presencia de dichos macrófagos intraalveolares yuxtatumorales PD-L1+ se incluyó en el concepto “estroma peritumoral”; para el análisis y discusión posteriores se mantuvo sin embargo de modo descriptivo esta observación en los casos en los que su presencia era significativa y fue por tanto reseñada.

IV. Valoración automática de la expresión inmunohistoquímica de CD8

La valoración de la expresión inmunohistoquímica de CD8 se realizó mediante patología digital y de manera automática utilizando la plataforma VENTANA iScan Coreo (Ventana Medical System Inc., Tucson, AZ, USA) disponible en el laboratorio (fig.7).

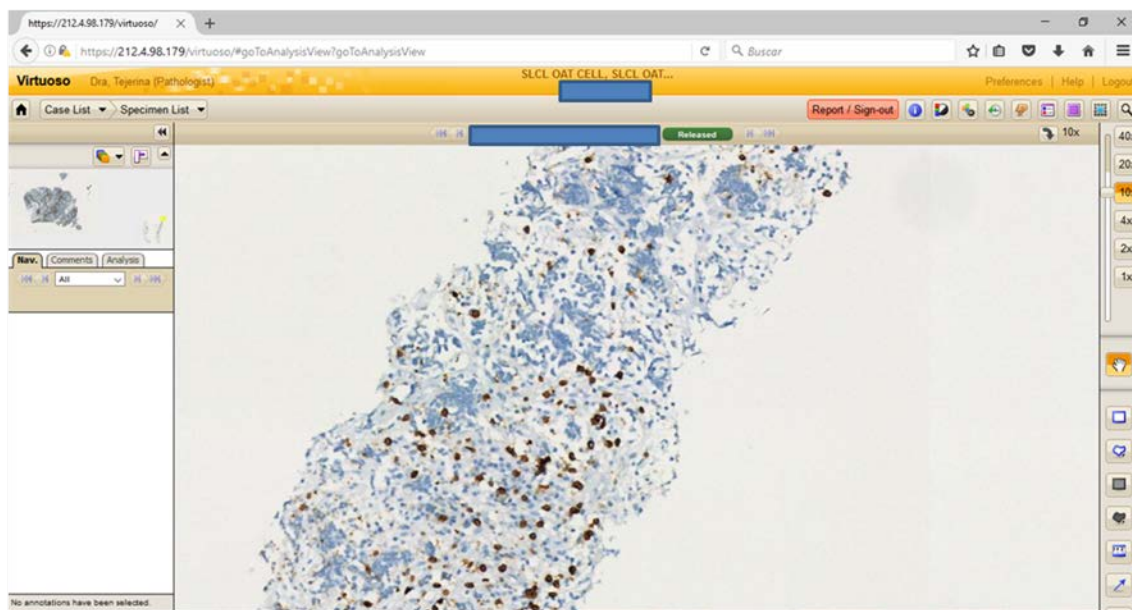


Figura 7. Valoración automática de CD8 con Ventana VIRTUOSO.

Para llevar a cabo este análisis, se escanearon todas las preparaciones inmunohistoquímicas con resolución 20x. Posteriormente, utilizando el software VENTANA Virtuoso, se revisó a bajo aumento la totalidad de la imagen escaneada para identificar y seleccionar las dos áreas de interés a evaluar, el epitelio tumoral y el estroma tumoral (tanto peri como yuxtatumoral). A continuación, utilizando un aumento de 20x y el algoritmo de valoración de Ki67 (aprobado por la FDA para el recuento del índice proliferativo en el cáncer de mama) se cuantificó la expresión inmunohistoquímica de CD8 en cada una de las dos áreas, recogiendo los siguientes datos:

-Tamaño del área evaluada, especificado por el sistema en micras cuadradas (μ^2). Posteriormente se realizaron los cálculos necesarios para transformar este dato a milímetros cuadrados (mm^2).

-Número de núcleos CD8+.

-Porcentaje de núcleos CD8+ sobre el total de núcleos presentes en el área seleccionada.

-Número de núcleos CD8+/ μ^2 y su posterior conversión a núcleos CD8+/mm².

Cuatro de las muestras no pudieron ser correctamente escaneadas por dificultades técnicas, siendo necesario realizar el análisis de forma manual. Éste se llevó a cabo calculando la equivalencia en μ^2 y en mm² del área seleccionada al microscopio óptico (20x), contando el número de núcleos CD8+ y calculando posteriormente el número de núcleos CD8+/mm².

V. Análisis estadístico

1. De las variables clínicas

Para la realización del análisis estadístico las variables no numéricas se codificaron como sigue:

-Sexo:

1= Masculino;

2= Femenino.

-Consumo de tabaco:

0= Nunca fumador;

1= Fumador activo/ex-fumador.

-Estado general o performance status (PS):

0= PS0;

1= PS1;

2= PS2;

3= PS3;

4= PS4;

5= No especificado (NE).

-Localización anatómica de la neoplasia en el momento del diagnóstico:

La agrupación, según criterios clínicos de estadificación, pronóstico e implicaciones terapéuticas, generó las siguientes categorías:

1= Tumor limitado al pulmón;

2= Tumor en pulmón + afectación de ganglios linfáticos mediastínicos;

3= Tumor en pulmón + metástasis en un órgano a distancia distinto a los ganglios linfáticos mediastínicos;

4= Tumor en pulmón + metástasis en dos o más órganos distintos a los ganglios linfáticos locorreionales;

5= Tumor en pulmón + afectación de ganglios linfáticos mediastínicos + metástasis en un órgano a distancia distinto a los ganglios linfáticos;

6= Tumor en pulmón + afectación de ganglios linfáticos mediastínicos + metástasis en dos o más órganos a distancia distintos a los ganglios linfáticos.

-Estadio clínico al diagnóstico:

1= Enfermedad localizada (EL);

2= Enfermedad extensa (EE).

3= No especificado.

El estadio TNM, determinado según la clasificación vigente que consta en International Union Against Cancer (UICC): TNM Classification of Malignant Tumours, 7ª ed., L.H. Sobin, Ch. Wittekind (eds.) Wiley, New York, se codificó de forma independiente para los epígrafes T, N y M en las siguientes categorías:

-Estadio T:

0= Tx;

1= T1;

2= T2;

3= T3;

4= T4.

5= no especificado.

-Estadio N:

0= N0;

1= N1;

2= N2;

3= N3

4= No especificado.

-Estadio M:

0= M0;

1= M1a;

2= M1b.

3= No especificado.

-Tratamiento quimioterápico:

0= No administrado;

1= Cisplatino/VP16;

2= Carboplatino/VP16;

3= Cisplatino/VP16 + Carboplatino/VP16;

4= Carboplatino/Taxol;

5= Carboplatino/Pemetrexed;

6= Cisplatino/VP16 + Veliparib.

7= No especificado.

-Tratamiento radioterápico:

0= No administrado;

1= Sí administrado;

2= No especificado.

La modalidad y los campos anatómicos de aplicación no fueron codificados, dado que el número de categorías generadas hacía poco probable obtener resultados con significación estadística.

-Recidiva tumoral:

0= Ausencia de recidiva: en esta categoría se incluyeron tanto los pacientes sin evidencia clínico-radiológica de recidiva como los pacientes en los que la aparición de nuevas áreas anatómicas de afectación por la enfermedad fue etiquetada, según criterios clínicos, como progresión y no como recidiva;

1= Presencia de recidiva;

2= No especificado.

-Estado del paciente en la fecha del último seguimiento:

- 1= Fallecido por la enfermedad;
- 2= Vivo con enfermedad persistente;
- 3= Vivo sin evidencia de enfermedad.
- 4= No especificado.

-Localización anatómica de la recidiva de la enfermedad

El/los órgano/s en los que se detectó la presencia de tumor por estudios de imagen, con o sin confirmación anatomopatológica) se agrupó según las implicaciones clínico-terapéuticas del órgano o combinación de órganos afectados, definiéndose las categorías siguientes:

- 1= Pulmón;
- 2= Pulmón + ganglios linfáticos mediastínicos;
- 3= Pulmón + un órgano a distancia distinto a los ganglios linfáticos mediastínicos;
- 4= Pulmón + dos o más órganos a distancia distintos a los ganglios linfáticos mediastínicos;
- 5= Pulmón + ganglios linfáticos mediastínicos + afectación de un órgano a distancia distinto a los ganglios linfáticos;
- 6= Pulmón + ganglios linfáticos mediastínicos + afectación de dos o más órganos a distancia distintos a los ganglios linfáticos.
- 7= Afectación de un órgano a distancia (distinto a los ganglios linfáticos);
- 8= Afectación de dos o más órganos a distancia (distintos a los ganglios linfáticos).
- 9= No especificado.

Las variables numéricas, es decir, la edad en el momento del diagnóstico, el tamaño tumoral en milímetros, el número total de ciclos de quimioterapia, la duración en meses del tratamiento quimioterápico, el intervalo libre de recaída en días y meses y la supervivencia global en días y meses se mantuvieron como datos numéricos netos, sin establecer intervalos.

2. De la expresión inmunohistoquímica de PD-L1

2.1. En las células tumorales

-La intensidad de tinción para PD-L1 se codificó según las categorías definidas en el apartado previo:

0= Ausencia de tinción;

1= Tinción débil;

2= Tinción intensa.

-El patrón de tinción intracelular PD-L1 o localización intracelular de la tinción PD-L1: una vez observada la existencia de diferencias de tinción entre el citoplasma y la membrana en las células tumorales PD-L1+, dicho patrón se codificó en las categorías previamente descritas:

0= Ausencia de tinción;

1= Patrón de tinción “membrana=citoplasma”, es decir, similar grado de tinción en la membrana y en el citoplasma;

2= Patrón de tinción “citoplasma>membrana”, es decir, mayor grado de tinción del citoplasma que de la membrana celular.

Como se ha dicho previamente, al no observarse casos con tinción de membrana superior a la citoplasmática en las células tumorales, no se incluyó el patrón de tinción “citoplasma<membrana”.

-La localización de las células positivas en los nidos tumorales: a la vista de las diferencias en la distribución de las células tumorales PD-L1+ en la zona central y periférica de los agregados epiteliales neoplásicos, los resultados se codificaron según las categorías previamente definidas por la proporción de células positivas para dicho marcador en las distintas zonas de los nidos tumorales, en orden decreciente cuando procediera:

0= Patrón “ausencia de tinción”, definido por la ausencia de expresión de PD-L1 en las células tumorales, en cualquier localización;

1= Patrón de localización “periferia=centro de los nidos tumorales”, es decir, presencia de células tumorales PD-L1+ en número similar en las zonas centrales y en la zona periférica de los agregados epiteliales neoplásicos;

2= Patrón de localización “periferia>centro de los nidos tumorales”, es decir mayor número de células tumorales PD-L1+ en la zona periférica que en las áreas centrales de los nidos neoplásicos;

3= Patrón de localización “periferia de los nidos tumorales”: es decir, identificación de células tumorales PD-L1+ únicamente en la zona periférica de los nidos neoplásicos.

Como se ha mencionado previamente, no se encontraron casos en los que la localización de las células neoplásicas PD-L1+ se observara exclusivamente en el centro de los nidos tumorales, por lo que no se incluyó el patrón “centro de los nidos tumorales”.

- El porcentaje de células tumorales PD-L1+: a fin de valorar la posible significación estadística de los valores de expresión inmunohistoquímica inferiores al 1%, los casos en los que se obtuvo dicho resultado porcentual se incluyeron en una categoría denominada “células tumorales PD-L1+ aisladas”. Los resultados iguales o superiores al 1% se mantuvieron como cifras porcentuales numéricas, netas en un primer análisis y posteriormente agrupadas por intervalos. Los intervalos definidos fueron:

a) Para el análisis comparativo de las “células tumorales PD-L1+ aisladas” frente a los casos restantes de la serie:

*1º grupo: 0% de células tumorales PD-L1+.

*2º grupo: 0,1% de células tumorales PD-L1+ (categoría de “células tumorales aisladas”).

*3º grupo: >0,1% de células tumorales PD-L1+.

b) Para el análisis de grupos de expresión combinada de PD-L1 en las células tumorales y en los TILs:

*Grupo T-: expresión de PD-L1 en las células tumorales del 0%.

*Grupo T+: expresión de PD-L1 en las células tumorales $\geq 0,1\%$.

c) Para el análisis según categorías especificadas para el clon SP142 recogidas por la IASLC:

*TC0: expresión de PD-L1 en las células tumorales <1% (incluye 0%).

*TC1: expresión de PD-L1 en las células tumorales de entre el 1% y <5%.

*TC2: expresión de PD-L1 en las células tumorales de entre el 5% y <50%.

*TC3: expresión de PD-L1 en las células tumorales $\geq 50\%$.

2.2. En los TILs:

-La intensidad de tinción PD-L1 se subclasificó, según los criterios descritos en el apartado previo, en las siguientes categorías:

0= Ausencia de tinción;

1= Tinción débil;

2= Tinción intensa.

-La localización intracelular de la tinción o patrón de tinción PD-L1: una vez observada la existencia de diferencias de tinción entre el citoplasma y la membrana en los TILs PD-L1+, dicho patrón se codificó según las categorías definidas en el apartado previo:

0= Patrón “ausencia de tinción”;

1= Patrón de tinción “membrana=citoplasma”, es decir, similar grado de tinción en la membrana y en el citoplasma;

2= Patrón de tinción “membrana>citoplasma”, es decir, mayor grado de tinción membranosa que citoplasmática;

3= Patrón de tinción “citoplasma>membrana”, es decir, mayor grado de tinción del citoplasma que de la membrana celular.

-La localización de los TILs en los distintos componentes de la neoplasia se codificó según las categorías definidas previamente:

0= Patrón “ausencia de TILs PD-L1+”, en cualquier localización.

1= Patrón de localización “interfase estroma/tumor>estroma peritumoral>intratumorales”: este patrón incluía los casos en los que los TILs PD-L1+ estaban presentes, en proporción decreciente, en el estroma localizado inmediatamente adyacente a los nidos tumorales (“interfase estroma/tumor”), en el estroma situado a cierta distancia de éstos entre unos agregados neoplásicos y otros (“estroma peritumoral”) y en el interior de los nidos neoplásicos (con similar distribución en éstos últimos en el centro y en la periferia).

2= Patrón de localización “estroma peritumoral>interfase estroma/tumor”: este patrón incluía los casos en los que los TILs PD-L1+ estaban presentes de forma exclusiva en el estroma (sin presencia acompañante de células positivas para dicho marcador en el interior de los nidos epiteliales neoplásicos), en proporción decreciente en el estroma situado a cierta distancia de éstos, entre unos agregados neoplásicos y otros (“estroma peritumoral”) y en el estroma localizado inmediatamente adyacente a los nidos tumorales (“interfase estroma/tumor”).

3= Patrón de localización “interfase estroma/tumor>estroma peritumoral”: este patrón incluía los casos en los que los TILs PD-L1+ estaban presentes de forma exclusiva en el estroma (sin presencia acompañante de células positivas para dicho marcador en el interior de los nidos epiteliales neoplásicos), en proporción decreciente en el estroma localizado inmediatamente adyacente a los nidos tumorales (“interfase estroma/tumor”) y en el estroma situado a cierta distancia de éstos, entre unos agregados neoplásicos y otros (“estroma peritumoral”).

4= Patrón de localización “interfase estroma/tumor>intratumorales (periferia de los nidos neoplásicos)”: este patrón incluía los casos en los que los TILs PD-L1+ estaban presentes, en proporción decreciente, tanto en el estroma (si bien de forma exclusiva en el localizado inmediatamente adyacente a los nidos tumorales, esto es, la “interfase estroma/tumor”) como en el interior de los nidos neoplásicos; en éstos los TILs PD-L1+ se localizaban mayoritariamente en la zona periférica.

5= Patrón de localización “intratumorales”: este patrón incluía los casos en los que los TILs PD-L1+ estaban presentes de forma exclusiva en el interior de los nidos neoplásicos (sin presencia de células inflamatorias positivas para dicho marcador en el estroma), ya fuera en el centro de los agregados epiteliales neoplásicos, en la zona periférica o en ambas.

-El tipo de células inflamatorias PD-L1+ en los TILs se codificó, según las categorías definidas en el apartado precedente, en:

0= Patrón “ausencia de tinción”.

1=Patrón “macrófagos=linfocitos”, cuando las células inflamatorias PD-L1+ de los TILs eran macrófagos y linfocitos en proporciones similares.

2= Patrón “macrófagos>linfocitos”, cuando entre las células inflamatorias PD-L1+ de los TILs predominaban los macrófagos sobre los linfocitos.

3= Patrón “macrófagos<linfocitos”, cuando entre las células inflamatorias PD-L1+ de los TILs los linfocitos predominaban sobre los macrófagos.

-El porcentaje de células PD-L1+ en los TILs: a fin de valorar la posible significación estadística de los valores de expresión inmunohistoquímica inferiores al 1%, los casos en los que se obtuvo dicho resultado porcentual se incluyeron en una categoría denominada “células inflamatorias PD-L1+ aisladas”. Los resultados iguales o superiores al 1% se mantuvieron como cifras porcentuales numéricas, netas en un primer análisis y posteriormente agrupadas por intervalos. Los intervalos definidos fueron:

a) Para el análisis comparativo de las “células inflamatorias PD-L1+ aisladas” frente a los casos restantes de la serie:

*1º grupo: 0% de células inflamatorias PD-L1+ en los TILs.

*2º grupo: 0,1% de células inflamatorias PD-L1+ en los TILs (categoría de “células aisladas”).

*3º grupo: >0,1% de células inflamatorias PD-L1+ en los TILs.

b) Para el análisis de grupos de expresión combinada de PD-L1 en las células tumorales y en los TILs:

*Grupo I-: expresión de PD-L1 en los TILs del 0%.

*Grupo I+: expresión de PD-L1 en los TILs $\geq 0,1\%$.

c) Para el análisis según categorías especificadas para el clon SP142 recogidas por la IASLC:

*IC0: expresión de PD-L1 en los TILs <1% (incluye 0%).

*IC1: expresión de PD-L1 en los TILs de entre el 1% y <5%.

*IC2: expresión de PD-L1 en los TILs de entre el 5% y <10%.

*IC3: expresión de PD-L1 en los TILs $\geq 10\%$.

3. De los linfocitos T CD8+

Al tratarse de datos numéricos y no habiéndose definido puntos de corte ni intervalos, los resultados en forma de recuento de células por campo 20x, estimación del número de células/mm² (n°/mm²) a partir del recuento por micra cuadrada (n°/μ²) y recuento porcentual sobre el total de células inflamatorias presentes en un campo 20x se manejaron de forma neta, sin agruparse en categorías.

4. Pruebas estadísticas

Se realizó un análisis descriptivo de las variables categóricas mediante frecuencias absolutas y relativas; y en las variables numéricas, mediante la mediana, percentiles 25 y 75, valores mínimo y máximo. El estudio estadístico posterior tuvo como objetivo valorar la existencia de asociación de los distintos aspectos morfológicos relativos a la expresión de PD-L1 entre sí, con los diferentes patrones de composición del microambiente inmune, y de éstos con los datos clínicos disponibles. Para ello se realizó análisis univariante con la prueba U Mann-Whitney para contrastar variables numéricas con dos categorías, prueba de Kruskal-Wallis cuando había más de dos categorías y análisis multivariante con la prueba de Chi-cuadrado o estadístico exacto de Fisher para contraste de hipótesis de variables categóricas, según procediera. Para analizar la supervivencia global y el intervalo libre de enfermedad de los diferentes grupos de expresión combinada de PD-L1 en las células tumorales y en los infiltrados inflamatorios asociados al tumor se utilizaron el test de Mantel-Cox y el método de Kaplan-Meier. El nivel de significación se fijó en 0,05 para todos los contrastes. Los resultados se recogieron en tablas y gráficas independientes. El paquete estadístico utilizado es Stata/IC v.14.2. (StataCorp. 2015. *Stata Statistical Software: Release 14*. College Station, TX: StataCorp LP.)

RESULTADOS

I. Variables clínicas

Las 90 muestras estudiadas correspondían a un total de 88 pacientes de los cuales 52 (59,09%) eran hombres y 36 (40,91%) mujeres con una mediana de edad de 65 años (42-87 años).

En cuanto al consumo de tabaco, del total de la serie, se obtuvo la información relativa a 68 pacientes (75,56% del total) los cuales eran fumadores activos o exfumadores; no se pudo aportar la información sobre el consumo de tabaco de los 20 pacientes restantes.

Con respecto al estado general de los pacientes al diagnóstico (67 pacientes con datos de ECOG), éste fue SP0 en 18 casos (26,88%), SP1 en 33 (49,25%), SP2 en 14 (20,89%), SP3 en 1 (1,49%) y SP4 en 1 caso (1,49%).

La enfermedad fue estadificada en EL y EE en 72 pacientes: 35 de ellos (48,61%) presentaban EL al diagnóstico y 37 (51,39%) EE.

En cuanto a los órganos afectados por la neoplasia, ésta estaba presente en el momento del diagnóstico únicamente en el pulmón en 7 casos (9,72 %), en el pulmón y los ganglios linfáticos mediastínicos en 27 casos (37,50%), en el pulmón y en un segundo órgano distinto a los ganglios linfáticos mediastínicos en 10 casos (13,89%), en el pulmón y dos o más órganos a distancia distintos a los ganglios mediastínicos en 17 casos (23,61%), en pulmón, ganglios linfáticos mediastínicos y un órgano a distancia en 6 casos (8,33%) y en pulmón, ganglios mediastínicos y dos o más órganos a distancia en 5 casos (6,94%).

En este mismo grupo de 72 pacientes, el estadio tumoral T (según clasificación TNM) fue: Tx en 4 casos (5,56%), T1 en 2 casos (2,78%), T2 en 17 casos (23,61%), T3 en 7 casos (9,72%) y T4 en 42 casos (58,33%).

El estadio N fue N0 en 7 casos (10%), N1 en 6 casos (8,57%), N2 en 28 casos (40%) y N3 en 29 casos (41,43%).

El estadio tumoral M fue M0 en 29 casos (40,28%), M1a en 6 (8,33%) y M1b en 37 casos (51,39%).

El dato del tamaño tumoral solo se recogió en 49 pacientes, variaba entre 10 mm de diámetro mínimo y 110 mm de diámetro máximo (mediana: 50.31 mm, con desviación estándar de 24,54 mm).

Se dispuso de información relativa al tratamiento quimioterápico en 71 pacientes. 67 de ellos (94,37%) recibieron alguno de los protocolos actualmente en vigor; en 6 casos (5,63%) no se administró quimioterapia. Las combinaciones de fármacos administradas fueron Cisplatino/VP16 (etopósido) en 32 casos (45,07%), Carboplatino/VP16 (etopósido) en 29 casos (40,85%), Carboplatino/Taxol en 2 casos (2,82%), Cisplatino/VP16 + Veliparib en 2 casos (2,82%), Cisplatino/VP16+Carboplatino/VP16 en 1 caso (1,41%) y Carboplatino/Pemetrexed en 1 caso (1,41%). El tratamiento radioterápico,

referido en 70 pacientes, se aplicó en 53 casos (75,71%); los 17 restantes (24,29%) no recibieron radioterapia.

Los datos de recidiva se recogieron en un total de 69 pacientes de la serie de los cuales 48 (69,57%) mostraron recidiva durante el seguimiento. En el grupo restante de 21 pacientes (30,43%) se incluyeron los casos sin evidencia clínico-radiológica de recidiva y los pacientes en los que la aparición de neoplasia en nuevas localizaciones anatómicas, fue tipificada como progresión de la enfermedad y no como recidiva.

La localización de dicha recidiva tumoral, referida en 42 pacientes, fue exclusivamente en pulmón en 6 casos (14,29%), en pulmón y ganglio linfático regionales en 5 casos (11,90%), en pulmón y un órgano a distancia distinto a los ganglios linfáticos regionales en 6 casos (14,29%), en pulmón y dos o más órganos a distancia (no ganglios linfáticos) en 3 casos (7,14%), en pulmón, ganglios linfáticos regionales y un órganos a distancia en 4 casos (9,52%), en pulmón, ganglios linfáticos y dos o más órganos a distancia en 1 caso (2,38%), únicamente en un órgano a distancia (sin recidiva pulmonar ni ganglionar) en 13 casos (30,95%) y en dos o más órganos a distancia en 4 casos (9,52%).

El intervalo libre de enfermedad, disponible en 48 pacientes, variaba entre 1 y 2690 días (mediana: 395.77 días, con desviación estándar de 543.65 días).

Del total de 67 pacientes de los que se obtuvieron datos relativos al estado en el último seguimiento, 54 (80,6%) fallecieron por la enfermedad. De los 13 pacientes restantes, vivos en la última revisión, 8 (11,94%) presentaban evidencia clínico-radiológica de enfermedad tumoral persistente, mientras que en los 5 restantes (7,46%) no se detectó neoplasia residual.

La supervivencia global, valorada en 70 pacientes, osciló entre 19 y 2719 días (0,63-91 meses), con una mediana de 18,4 meses+/- 21,28 meses.

II. Estudio morfológico y valoración cuantitativa

1. Cuantificación de linfocitos T CD8+ (Figs. 8 y 9)

a) En los nidos tumorales

El número de linfocitos T CD8+ en los nidos tumorales osciló entre 0 y 681 (mediana: 71,46 linfocitos, con desviación estándar de 106,03). La distribución en percentiles se refleja en la tabla siguiente:

Nidos tumorales	n	p25	p50	p75
Nº de linfocitos T CD8+ (20x)	90	8	28	99

El porcentaje de linfocitos T CD8+ sobre el total de núcleos presentes en los nidos tumorales osciló entre 0 y 79% (mediana: 17,86%, con desviación

estándar de 20,92%). La distribución en percentiles figura en la tabla siguiente:

Nidos tumorales	n	p25	p50	p75
% de linfocitos T CD8+ (20x)	90	2	9	25

El número de linfocitos T CD8+/mm² de epitelio neoplásico se situó entre 0 y 3111 (mediana: 669,66 linfocitos, con desviación estándar de 807,26). La table siguiente recoge la distribución en percentiles:

Nidos tumorales	n	p25	p50	p75
Nº de linfocitos T CD8+ / mm ²	90	66	306,5	994

b) En el estroma tumoral

El número de linfocitos T CD8+ presentes en el estroma tumoral osciló entre 0 y 359 (mediana: 68,09 linfocitos, con desviación estándar de 65,89). La siguiente tabla refleja la distribución en percentiles:

Estroma tumoral	n	p25	p50	p75
Nº de linfocitos T CD8+ (20x)	90	23	40	90

El número de linfocitos T CD8+/mm² de estroma tumoral osciló entre 0 y 3702 (mediana: 853,31 células, con desviación estándar de 719,504). La distribución en percentiles aparece en la tabla siguiente:

Estroma tumoral	n	p25	p50	p75
Nº de linfocitos T CD8+ / mm ²	90	350	693,5	1117

El porcentaje de linfocitos T CD8+ sobre el total de células presentes en el estroma tumoral (inflamatorias y mesenquimales, osciló entre 0 y 85% (mediana: 31,903%, con desviación estándar de 18,18%). La distribución en percentiles figura en la tabla siguiente:

Estroma tumoral	n	p25	p50	p75
% de linfocitos T CD8+ (20x)	90	18	30	43

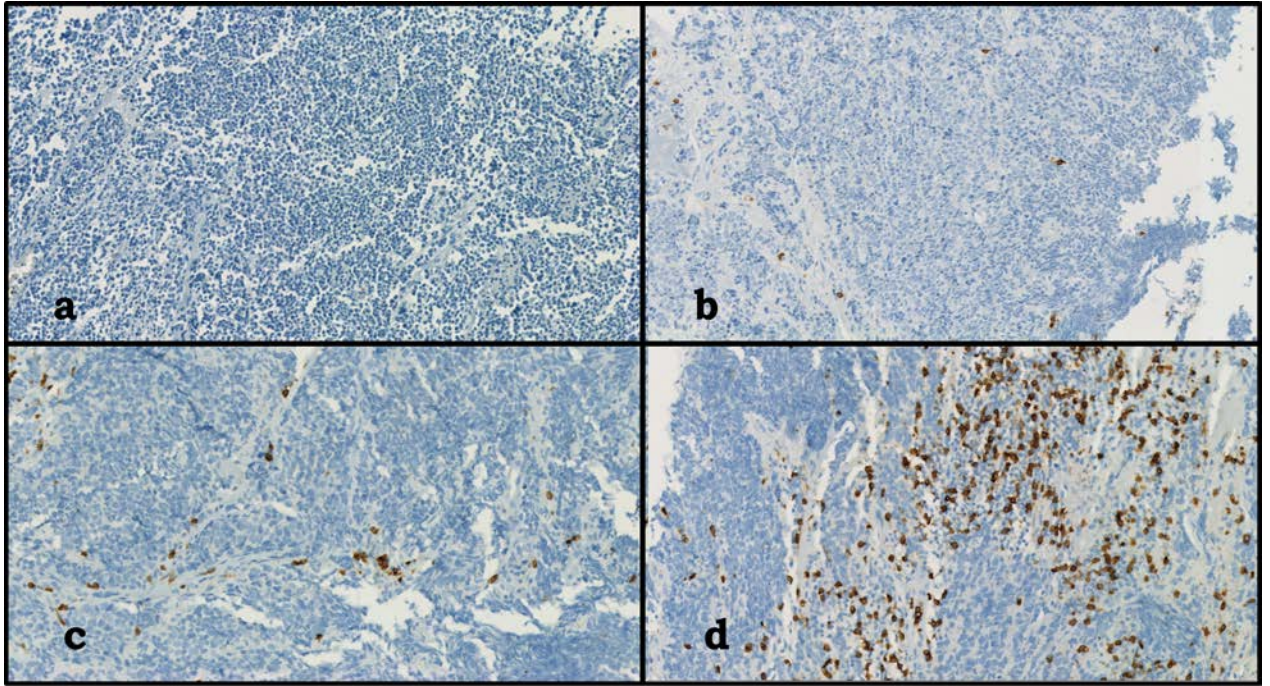


Figura 8. Variación en la proporción de linfocitos T CD8+ en los TILs: a) ausencia de linfocitos T CD8+; b) <1% (células aisladas); c) 10%; d) 50% (Tinción inmunohistoquímica para CD8, 20x).

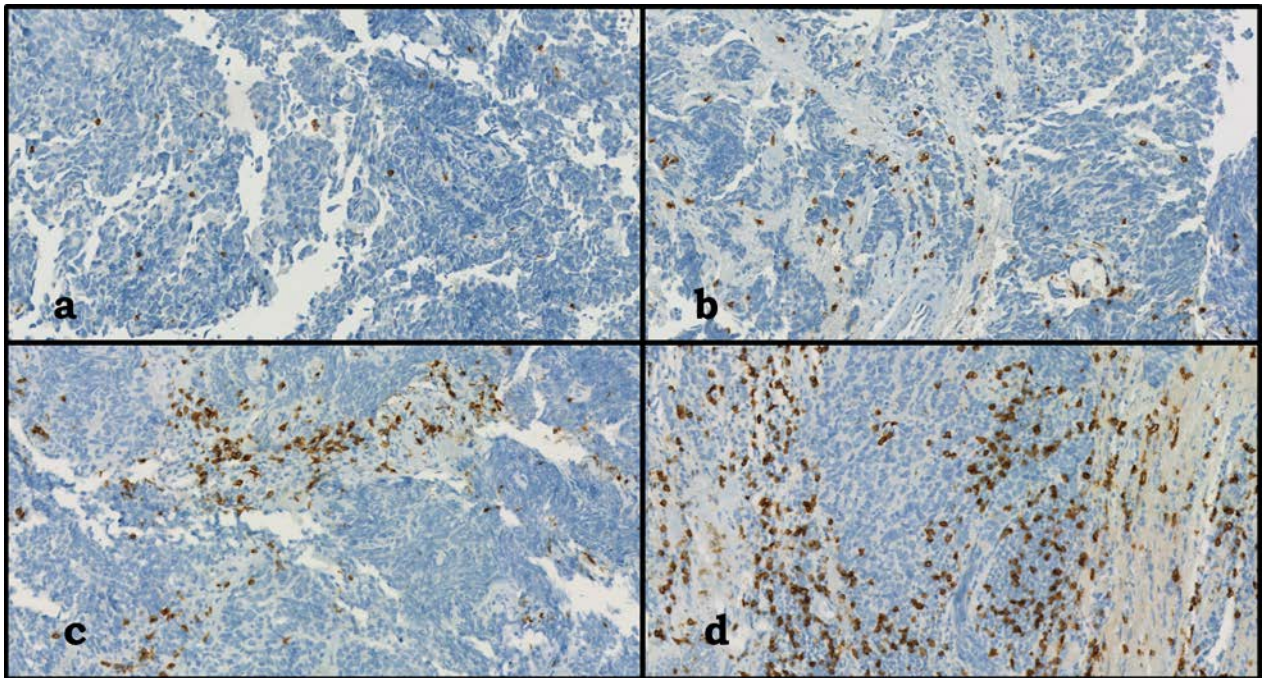


Figura 9. Localización de los linfocitos T CD8+ en el estroma y en los nidos tumorales: a) en el interior de los nidos epiteliales neoplásicos; b) en el estroma yuxtatumoral; c) en el estroma yuxtatumoral y peritumoral; d) en el estroma y en el interior de los nidos neoplásicos (Tinción inmunohistoquímica para CD8, 20x).

2. Valoración de la expresión inmunohistoquímica de PD-L1

2.1. En las células tumorales (Figs. 10 y 11)

2.1.1. Intensidad de tinción

De las 90 muestras evaluadas se observó tinción inmunohistoquímica para PD-L1 en las células tumorales en un total de 44 muestras (48,89%), que se definió como débil en 5 casos (5,56%) e intensa en 39 muestras (43,33%). En 46 muestras (51,1% del total) la tinción resultó negativa

En las 44 muestras positivas, el porcentaje de células tumorales PD-L1+ osciló entre el 0 y el 80% (mediana: 5,06%, con desviación estándar de 14,99%).

La distribución en percentiles de dichos porcentajes según la intensidad de tinción de PD-L1 en las células tumorales se refleja en la tabla siguiente:

Tinción de PD-L1 en las células tumorales	n	p25	p50	p75
Ausente	46	0%	0%	0%
Débil	5	0,1%	0,1%	0,1%
Intensa	39	0,1%	5%	10%
	90			

Test de Mann-Whitney, $p=0.0284$

En 4 de los 5 casos con tinción débil (80%) el porcentaje de células tumorales PD-L1+ por campo 20x fue inferior al 1%, apareciendo en forma de células aisladas, y en 1 caso (20%) el porcentaje fue del 1%.

2.1.2. Patrón de tinción intracelular

En relación al patrón de tinción intracelular, en las 44 muestras PD-L1+ se observó mayor intensidad de tinción en el citoplasma que en la membrana en 24 muestras (54,55%) y similar intensidad en la membrana y en el citoplasma en 20 muestras (45,45%).

De los 5 casos con tinción débil, en 3 (60%) ésta fue mayor en el citoplasma que en la membrana, siendo similar en ambas localizaciones en los 2 restantes (40%). De los 39 casos con tinción intensa, en 21 (53,81%) ésta fue mayor en el citoplasma que en la membrana; en 18 (46,5%) fue similar en ambas localizaciones.

2.1.3. Localización de las células tumorales PD-L1+ en el tumor

Las células tumorales PD-L1+ eran más numerosas en la periferia que en el centro de los nidos tumorales en 31 muestras (70,45% del total de casos positivos). En 7 casos se identificaron células PD-L1+ únicamente en la periferia de los agregados de células neoplásicas (15,9% del total) y en 6 muestras (13,65%) la proporción de células tumorales positivas fue muy similar en el centro de los nidos y en la zona periférica de los mismos.

Localización de las células tumorales	n	%
Ausente	46	51,11
Periferia=centro de los nidos neoplásicos	6	6,67
Periferia> centro de los nidos neoplásicos	31	34,44
Solo en la periferia de los nidos neoplásicos	7	7,78
	90	100

De los 5 casos con tinción débil, en 3 (60%), las células neoplásicas PD-L1+ eran más numerosas en la periferia que en el centro de los nidos; en los 2 restantes (40%) se localizaban únicamente en la periferia de los agregados neoplásicos. No se observó ningún caso en el que las células positivas se distribuyeran de forma similar en ambas localizaciones. De los 39 casos con tinción intensa, en 28 (71,79%) las células neoplásicas PD-L1+ eran más numerosas en la periferia que en el centro de los nidos; en 6 (15,38%) aparecían en número similar en ambas localizaciones, y en 5 casos (12,82%) se situaban exclusivamente en la periferia de los agregados neoplásicos.

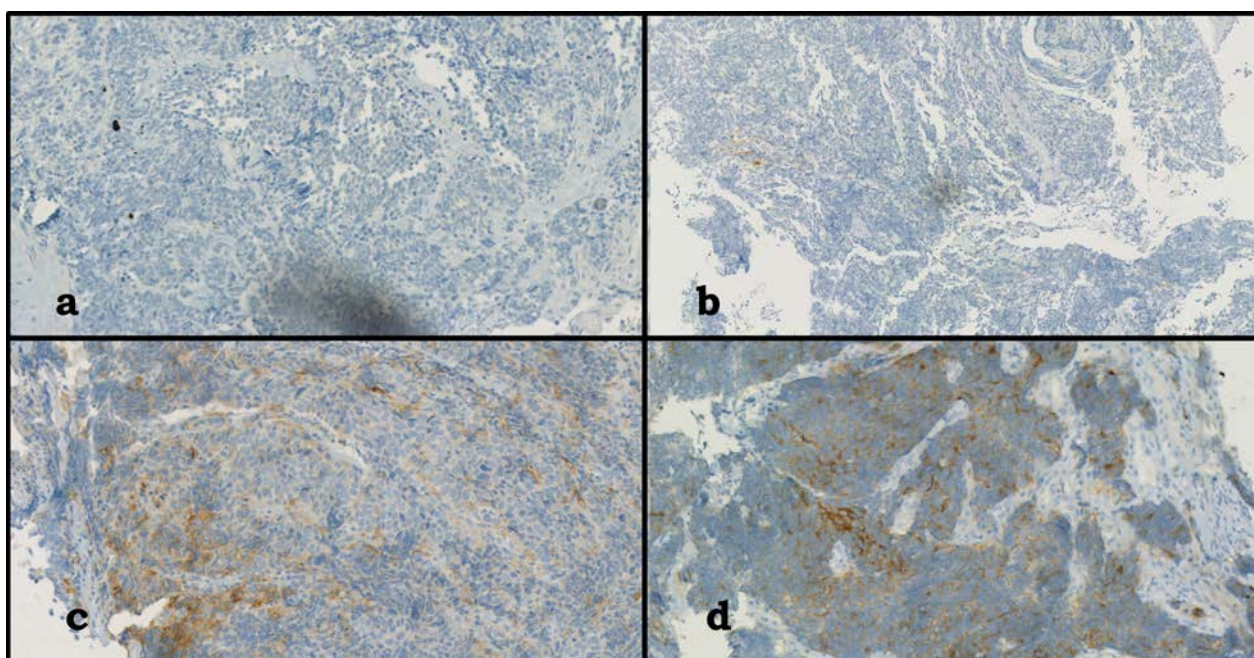


Figura 10. Expresión de PD-L1 en las células tumorales PD-L1+: a) ausencia de tinción; b) Tinción en “células tumorales aisladas”; c) <50% de células tumorales PD-L1+; d) >50% de células tumorales PD-L1+ (Tinción inmunohistoquímica para PDL-1, 20x).

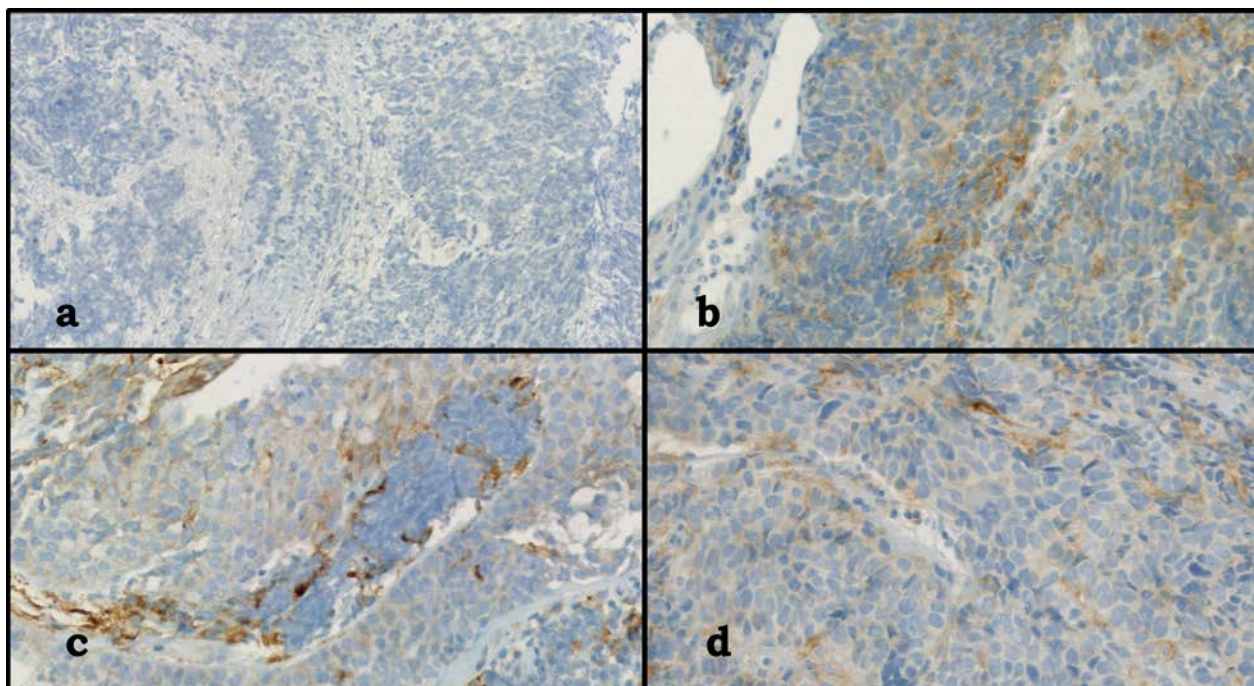


Figura 11. Localización de las células tumorales PD-L1+ en los nidos neoplásicos: a) Ausencia de células tumorales PD-L1+; b) Periferia= centro de los nidos neoplásicos; c) Periferia>centro de los nidos neoplásicos; d) Solo en la periferia de los nidos (Tinción inmunohistoquímica para PD-L1, 40x).

2.2. En la células inflamatorias asociadas al tumor (TILs) (Figs. 12 y 13)

2.2.1. Intensidad de tinción

De las 90 muestras evaluadas se observó tinción inmunohistoquímica positiva para PD-L1 en las células inflamatorias de los infiltrados asociados al tumor (TILs) en un total de 53 muestras (58,89%), descrita como débil en 3 (5,66%, 3,33% del total) e intensa en 50 casos (94,34%, 55,56% del total). En las 37 muestras restantes (41,1% del total) la tinción para PD-L1 resultó negativa.

En las 53 muestras positivas el porcentaje de TILs PD-L1+ osciló entre el 0 y el 100% (mediana: 14.56%, con desviación estándar de 25.36%): Percentil 50: 0,1%; percentil 25: 0%; percentil 75: 10%.

En 2 de los 3 casos con tinción débil (66,67%) el porcentaje de células inflamatorias PD-L1+ por campo 20x fue inferior al 1%, teniendo alguna célula aislada, y en 1 caso (33,33%) el porcentaje fue del 5%.

2.2.2. Patrón de tinción intracelular

En relación a la localización intracelular de la tinción PD-L1 el patrón de tinción PD-L1, de las 53 muestras positivas en los TILs se observó mayor intensidad de tinción en la membrana que en el citoplasma en 27 muestras (50,94%), mayor intensidad de tinción en el citoplasma que en la membrana

en 13 muestras (24,53% del total) y similar intensidad en la membrana y en el citoplasma en 13 muestras (24,53%).

2.2.3. Localización de los infiltrados inflamatorios PD-L1+ en el tumor

Las células inflamatorias asociadas al tumor PD-L1+ estaban presentes en el estroma (incluyendo en este concepto tanto el localizado inmediatamente adyacente a los nidos tumorales, esto es, la localización denominada en este estudio “interfase estroma/tumor” como el situado a cierta distancia de éstos entre unos agregados neoplásicos y otros, esto es, el denominado “estroma peritumoral”) y en los nidos neoplásicos de forma simultánea en 27 muestras (50,94% del total de 53 muestras con células inflamatorias PD-L1+), en el estroma de forma exclusiva en 22 muestras (41,51% del total de casos con células inflamatorias PD-L1+) y únicamente en el interior de los nidos neoplásicos en 4 muestras (7,55% del total de muestras con células inflamatorias PD-L1+). De las 22 muestras de localización exclusiva en el estroma, en 13 (59,09%, 25,56% del total de casos con TILs PD-L1+) las células inflamatorias PD-L1+ se localizaban en mayor número en la interfase estroma/tumor que en el estroma peritumoral situado entre los nidos neoplásicos, ajustándose pues al patrón decreciente definido en este estudio como “interfase estroma/tumor>estroma peritumoral” y en 9 casos esta distribución se invertía, siendo más numerosas en el estroma peritumoral que en la interfase; estos casos se incluyeron, según patrón de localización decreciente, en la categoría denominada “estroma peritumoral>interfase estroma/tumor”. En la totalidad de las 27 muestras con células inflamatorias PD-L1+ presentes tanto en el estroma como en los nidos tumorales (100%, 50,94% del total de casos con TILs PD-L1+), éstas predominaban en el estroma sobre el tumor y, dentro del estroma, en el inmediatamente adyacente a los agregados neoplásicos (interfase estroma/tumor); estos casos pues se incluyeron en la categoría definida según patrón de localización decreciente como “interfase estroma/tumor>estroma peritumoral>intratumorales”. Respecto a la distribución de los TILs PD-L1+ en el interior de los nidos tumorales, en 23 muestras (85,18%, 43,4% del total de casos con TILs PD-L1+) las células se distribuían de manera similar en el centro y en la periferia de los agregados, es decir, se ajustaban a la categoría definida según patrón de localización decreciente como “interfase estroma/tumor>estromaperitumoral>intratumorales”, mientras que en 4 (14,82%, 7,55% del total de casos con TILs PD-L1+) se situaban únicamente en la zona periférica de éstos, por lo que se incluyeron en la categoría definida según patrón de localización decreciente como “interfase estroma/tumor>intratumorales (periferia)”. En las 4 muestras con TILs PD-L1+ de localización exclusiva en los agregados neoplásicos, sin células PD-L1+ acompañantes en el estroma (4,44% del total de casos con células inflamatorias PD-L1+), éstas aparecían en número similar en el centro y en la periferia de los nidos, sin que se observara preferencia por alguna de ambas zonas.

2.2.4. Composición de los infiltrados inflamatorios asociados al tumor PD-L1+

Con respecto a la composición de los infiltrados inflamatorios asociados al tumor PD-L1+ (un total de 53 muestras), en 24 (45,28%) predominaban los macrófagos sobre los linfocitos, en 18 (33,96%) los linfocitos eran más numerosos que los macrófagos y en 11 muestras (20,76%) ambos tipos celulares estaban presentes en proporciones similares.

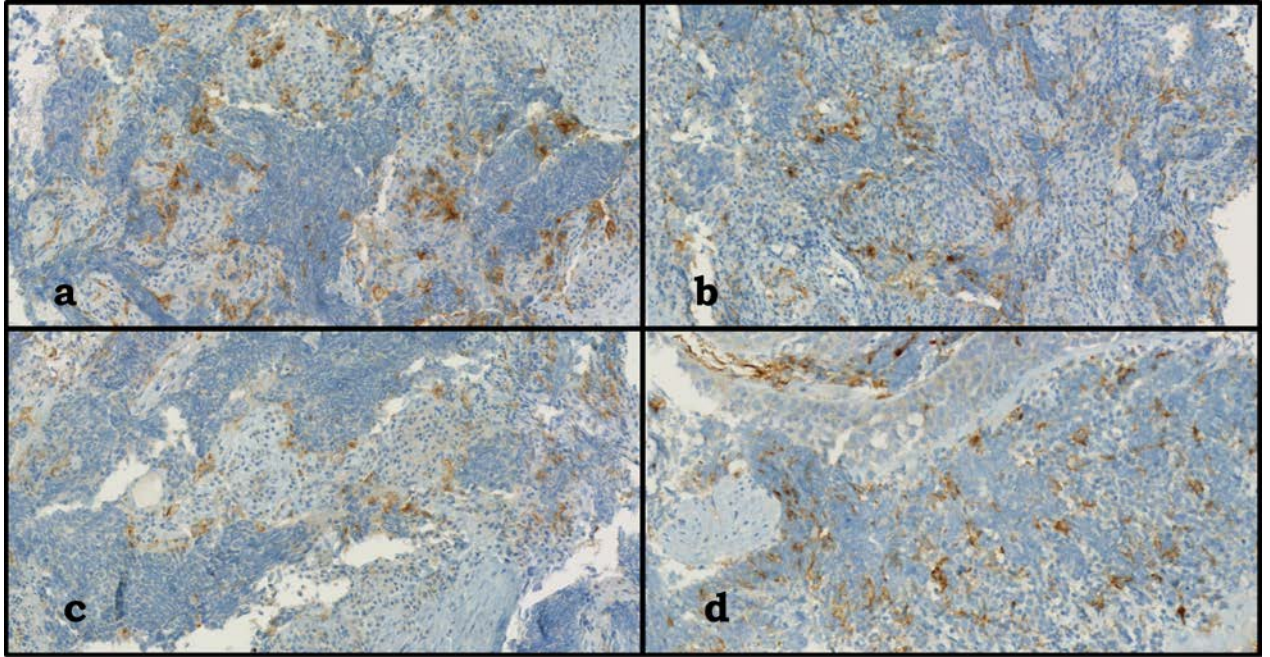


Figura 12. Localización de los TILs PD-L1+: a) Interfase estroma/tumor>estroma peritumoral>intratumorales; b) Interfase estroma/tumor>estroma peritumoral; c) Estroma peritumoral>interfase estroma/tumor; d) Intratumorales (Tinción inmunohistoquímica para PDL-1, 20x).

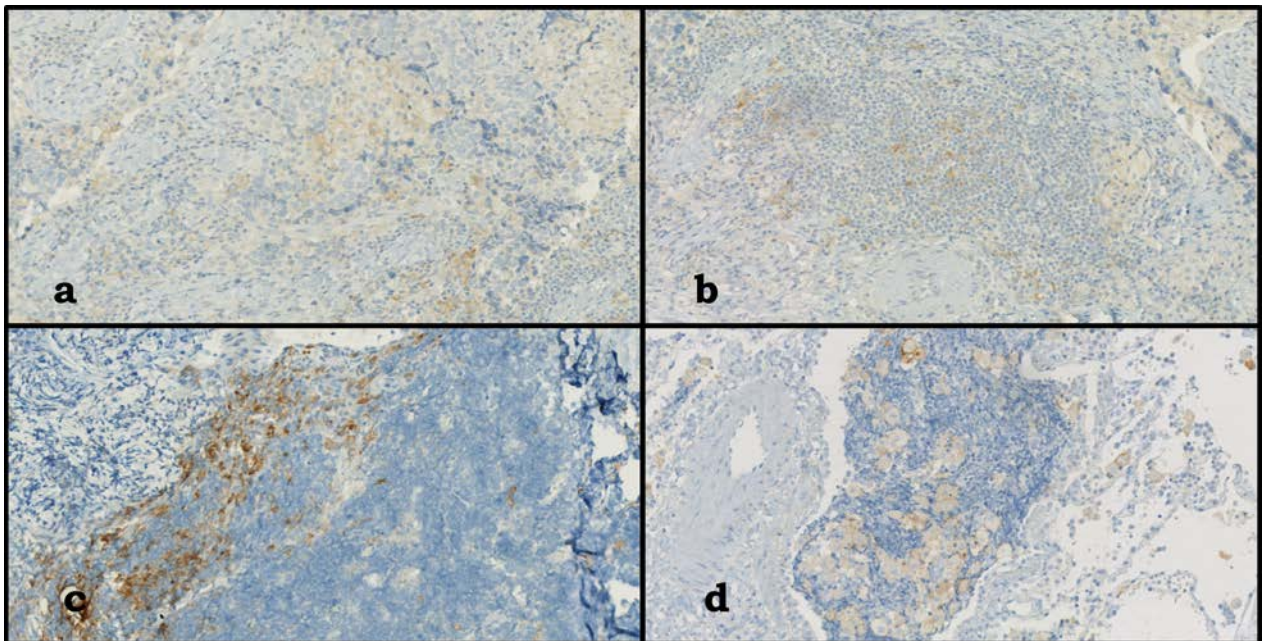


Figura 13. Composición de los TILs D-L1+ a) Macrófagos>linfocitos; b) Macrófagos<linfocitos; c) Macrófagos=linfocitos; d) Macrófagos intraalveolares PD-L1+ (Tinción inmunohistoquímica para PD-L1, 20x).

III. Asociación de la expresión de PD-L1 en las células tumorales y en los TILs

1. Relación del resultado de la tinción de PD-L1 en las células tumorales y en los TILs

De las 46 muestras en las que no se observó expresión de PD-L1 en las células neoplásicas, en 35 de ellas (76,09%) tampoco se detectó positividad para PD-L1 en los TILs. Las 11 muestras restantes (23,91%) si mostraron, en los TILs, positividad para PD-L1, que además fue descrita en todos ellos como intensa. De las 44 muestras con células neoplásicas PD-L1+ (intensa en 39 casos y débil en 5), en 42 casos (95,45%) los TILs fueron también positivos para dicho marcador (débil en 3 casos e intensa en 39), mientras que en 2 casos (4,55%) resultaron negativas. En estas 2 muestras negativas la positividad para PD-L1 en las células tumorales se describió como intensa. De las 42 muestras en las que se observó expresión de PD-L1 tanto en las células tumorales como en los TILs, ésta fue intensa en ambos tipos celulares en 37 muestras (88,1%) y débil en 3 muestras (7,14%); las 2 muestras restantes (4,76%) mostraron positividad intensa en los TILs y débil en las células neoplásicas.

2. Relación de la expresión de PD-L1 en las células tumorales con el patrón de tinción en los TILs

De las 46 muestras en las que las células tumorales fueron negativas para PD-L1, 11 (23,91%) mostraron sin embargo expresión de dicho marcador en los TILs. De estos 11 casos, en 6 (54,55%) se observó predominio de la tinción membranosa sobre la citoplasmática, en 3 (27,27%) el patrón de tinción intracelular fue de similar intensidad en la membrana que en el citoplasma y en 2 casos (18,18%) fue mayor la tinción citoplasmática que la membranosa. De las 42 muestras con expresión de PD-L1 en las células tumorales y en los TILs, en 21 de ellas (50%) los TILs mostraron predominio de la tinción membranosa sobre la citoplasmática, en 11 casos (23,81%) fue mayor la tinción citoplasmática que la membranosa y en 10 (26,19%) el patrón de tinción intracelular fue de similar intensidad en la membrana que en el citoplasma. Dentro de este grupo de coexpresión, y de los 37 casos con tinción intensa de células tumorales, en 20 muestras (54,06%) predominó el patrón de tinción membranoso sobre el citoplasmático en los TILs, en 9 (24,32%) fue más intenso el citoplasmático que el membranoso y en 8 muestras (21,62%) fue similar en ambas localizaciones intracelulares. En relación a las 5 muestras con tinción débil en las células tumorales, en 2 casos (40%) predominó el patrón de tinción citoplasmático sobre el membranoso en los TILs, en 2 (40%) fue similar en ambas localizaciones y en 1 (20%) resultó más intenso el patrón citoplasmático que el membranoso.

3. Relación de la expresión de PD-L1 en las células tumorales con la composición de TILs

Al analizar las 11 muestras PD-L1 positivo en los TILs pero no en las células tumorales en 6 de ellas (54,55%) se observó predominio de los macrófagos

sobre los linfocitos en los infiltrados asociados al tumor, en 3 muestras (27,27%) predominaban los linfocitos sobre los macrófagos y en 2 de ellas (18,18%) ambos tipos celulares estaban presentes en los infiltrados en proporciones análogas. De las 42 muestras con co-expresión de PD-L1 en las células tumorales y en los TILs, en 18 muestras (42,86%) se observó un predominio de los macrófagos sobre los linfocitos, en 15 (35,71%) predominaban los linfocitos sobre los macrófagos y en 9 (21,43%) ambos tipos celulares estaban presentes en cuantía similar. Dentro de este grupo de co-expresión, y de las 37 muestras con tinción intensa de PD-L1 en las células tumorales, en 17 (45,95%) eran los macrófagos las células mayoritarias en los infiltrados, en 13 (35,14%) predominaban los linfocitos y en 7 muestras (18,91%) ambos aparecían en proporciones similares. Respecto a las 5 muestras con tinción débil para PD-L1 en las células tumorales, en 2 muestras (40%) predominaban los linfocitos sobre los macrófagos en los infiltrados, en 2 (40%) macrófagos y linfocitos aparecían en cuantía similar y en 1 de ellas (20%) los macrófagos constituían el tipo celular predominante.

4. Relación de la expresión de PD-L1 en las células tumorales con la localización de los TILs

De las 11 muestras que mostraron positividad para PD-L1 en los TILs pero no en las células tumorales (23,91% de un total de 46), en 6 de ellas (54,55%) los TILs PD-L1 positivos estaban presentes tanto en el estroma tumoral como en los nidos neoplásicos y en 5 muestras (45,45%) aparecían en el estroma tumoral pero no en los nidos neoplásicos; no se observaron muestras en las que la localización de los TILs PD-L1+ fuera exclusiva en los nidos tumorales, sin presencia asociada de células PD-L1 + en el estroma. En este grupo de 11 pacientes, la distribución de las células inflamatorias PD-L1 + según los patrones de distribución decreciente definidos para el estudio fue como sigue: en 4 muestras (36,36%) los infiltrados PD-L1 + aparecían en la interfase estroma/tumor>estroma peritumoral>nidos tumorales; en 4 muestras (36,36%) el patrón de localización fue el definido como “estroma peritumoral>interfase estroma/tumor”; en 2 (18,18%) presentaban la distribución “interfase estroma/tumor>estroma peritumoral” (sin evidencia de células inflamatorias positivas en los nidos neoplásicos) y en 1 caso (9,1%) eran más numerosas en la interfase estroma tumor que en los nidos tumorales (patrón interfase estroma/tumor>intratumorales-periferia, sin evidencia de células inflamatorias positivas acompañantes en los nidos neoplásicos); como ya se ha mencionado, no se observó en ninguno de ellos localización exclusiva de los TILs PD-L1+ en el interior de los nidos tumorales, sin acompañamiento en el estroma peritumoral. En todas las muestras en las que las células inflamatorias PD-L1 positivas aparecían tanto en los nidos tumorales como en distintas áreas del estroma tumoral (6 casos de 11), se observó un predominio de la localización en áreas estromales inmediatamente adyacentes a los agregados neoplásicos (la denominada “interfase estroma/tumor”) sobre las zonas del estroma algo más alejadas de las células tumorales (el “estroma peritumoral”), situadas entre unos nidos y otros. De los

5 casos con células PD-L1+ localizadas únicamente en el estroma, y no en los nidos neoplásicos, en 4 casos (80%) predominaba la localización en el estroma peritumoral sobre la interfase estroma/tumor, mientras que en 1 (20%) la proporción ocurría a la inversa.

De los 42 casos con co-expresión de PD-L1 en las células tumorales y en los TILs, en 21 muestras (50%) los TILs PD-L1+ estaban presentes tanto en el estroma tumoral como en los nidos neoplásicos, en 17 muestras (40,48%) aparecían en el estroma tumoral pero no en los nidos neoplásicos y en 4 (9,52%) se localizaban de forma exclusiva en los nidos tumorales, sin presencia asociada de células PD-L1+ en el estroma. En este grupo de 42 muestras, la distribución de las células inflamatorias PD-L1+ según los patrones de distribución decreciente definidos para el estudio fue como sigue: en 19 casos (45,24%) los infiltrados PD-L1+ aparecían en la interfase estroma/tumor>estroma peritumoral>nidos tumorales; en 12 casos (28,57%) el patrón de localización fue interfase estroma/tumor>estroma peritumoral (sin evidencia de células inflamatorias positivas acompañantes en los nidos neoplásicos); en 5 casos (11,91%) el patrón fue estroma peritumoral>interfase estroma tumor (sin evidencia de células inflamatorias positivas en los nidos neoplásicos); en 4 casos (9,52%) se observó localización exclusiva de las células inflamatorias PD-L1+ en el interior de los nidos tumorales y en 2 casos (4,76%) estas células eran más numerosas en la interfase estroma tumor que en los nidos tumorales; en éstos últimos las células tendían además a aparecer en zona periférica (patrón interfase estroma/tumor>intratumorales-periferia). Dentro de este grupo de coexpresión, y de los 37 casos en los que se observó tinción intensa de PD-L1 en las células tumorales, en 20 (54,05%) los TILs PD-L1+ estaban presentes tanto en el estroma tumoral como en los nidos neoplásicos, en 13 casos (35,14%) aparecían en el estroma tumoral pero no en los nidos neoplásicos y en 4 casos (10,81%) se localizaban de forma exclusiva en los nidos tumorales, sin presencia asociada de células PD-L1+ en el estroma. En este grupo de 37 pacientes, la distribución de las células inflamatorias PD-L1+ según los patrones de distribución decreciente definidos para el estudio fue como sigue: en 18 casos (48,65%) los infiltrados PD-L1+ aparecían en la interfase estroma/tumor>estroma peritumoral>nidos tumorales; en 11 casos (29,74%) el patrón de localización fue interfase estroma/tumor>estroma peritumoral (sin evidencia de células inflamatorias positivas acompañantes en los nidos neoplásicos); en 4 casos (10,81%) se observó localización exclusiva de las células inflamatorias PD-L1+ en el interior de los nidos tumorales; en 2 casos (5,4%) el patrón fue estroma peritumoral>interfase estroma tumor (sin evidencia de células inflamatorias positivas en los nidos neoplásicos); y en otros 2 casos (5,4%) estas células eran más numerosas en la interfase estroma tumor que en los nidos tumorales; en éstos últimos las células tendían además a aparecer en zona periférica, es decir, se ajustaban al patrón “interfase estroma/tumor>intratumorales (periferia)”. De las 5 muestras con tinción débil para PD-L1 en las células tumorales, en 4 muestras (80%) los TILs PD-L1+ aparecían en el estroma tumoral pero no en los nidos neoplásicos y

únicamente en 1 muestra (20%) estaban presentes tanto en el estroma tumoral como en los nidos neoplásicos; no se observaron casos en los que las células inflamatorias positivas se localizaran de forma exclusiva en los nidos tumorales, sin presencia asociada de células PD-L1+ en el estroma. La distribución de las células inflamatorias PD-L1+ según los patrones de distribución decreciente definidos para el estudio fue como sigue: en 3 muestras (60%) los infiltrados PD-L1+ aparecían en la interfase estroma/tumor en mayor grado que en el estroma peritumoral, sin evidencia de células inflamatorias positivas acompañantes en los nidos neoplásicos (patrón estroma peritumoral>interfase estroma/tumor); en 1 muestra (20%) las células inflamatorias positivas aparecían en la interfase estroma/tumor en mayor cuantía que en el estroma peritumoral, también sin evidencia de células inflamatorias positivas acompañantes en los nidos neoplásicos (patrón interfase estroma/tumor>estroma peritumoral) y en 1 muestra (20%) el patrón de localización fue interfase estroma/tumor>estroma peritumoral>nidos tumorales. No se observaron muestras en los que las células inflamatorias positivas se localizaran de forma exclusiva en los nidos tumorales, sin presencia asociada de células PD-L1+ en el estroma (patrón “intratumorales”), ni tampoco casos con patrón interfase estroma/tumor>intratumorales-periferia.

IV. Asociación de variables clínicas con la expresión inmunohistoquímica de PD-L1

1. En las células tumorales

a) Consumo de tabaco, edad, sexo y ECOG

De los 68 pacientes fumadores (activos o ex-fumadores), 35 (51,47%) resultaron negativos para PD-L1 en las células tumorales y 33 casos (48,53%) fueron positivos; de estos últimos, en 30 (44,12% del total de pacientes fumadores), la tinción fue intensa y en 3 (4,41% del total de pacientes fumadores) se describió como débil.

No se encontró asociación entre edad, sexo ni el ECOG con la expresión de PD-L1 en las células tumorales.

b) Localización del tumor

El análisis de localización del tumor, localización y estadio TNM se ha realizado sobre un total de 72 pacientes con información disponible. De los 7 pacientes con afectación pulmonar exclusiva se observó positividad para PD-L1 en las células tumorales en 6 casos (85,71%); en 5 de ellos la tinción fue descrita como intensa y en 1 caso como débil. El caso restante fue negativo.

De los 27 pacientes con afectación pulmonar y de ganglios linfáticos mediastínicos se observó ausencia de tinción en 15 (55,56%) y positividad para PD-L1 en las células tumorales en 12 casos (44,44%), clasificada como intensa en 10 (83,33%, 37,04% del total de casos con afectación pulmonar y

ganglionar mediastínica) y como débil en 2 casos (16,67%, 7,41% del total de casos con afectación pulmonar y ganglionar mediastínica).

Del grupo de 10 pacientes con afectación pulmonar y metástasis en un solo órgano a distancia, 6 (60%) fueron negativos para PD-L1 en las células tumorales y 4 casos (40%) fueron positivos para dicho marcador con una tinción intensa.

De los 17 pacientes con afectación pulmonar y metástasis en dos o más órganos a distancia, 10 (58,82%) fueron negativos para PD-L1 en las células tumorales y 7 casos (41,18%) fueron positivos para dicho marcador; de éstos últimos, en 6 muestras (85,71%, 35,29% del total de casos con afectación pulmonar y metástasis en dos o más órganos a distancia) la tinción fue intensa y en 1 caso (14,29%, 5,88% del total de casos con afectación pulmonar y metástasis en dos o más órganos a distancia) se clasificó como débil.

Del grupo de 6 pacientes con afectación pulmonar y ganglionar mediastínica y metástasis en un órgano a distancia, en 4 (66,67%) se observó positividad intensa para PD-L1 en las células tumorales, y los 2 casos restantes (33,33%) fueron negativos.

Del grupo de 5 pacientes con afectación pulmonar y ganglionar mediastínica y metástasis en dos o más órganos a distancia, la tinción para PD-L1 en las células tumorales fue negativa en 3 casos (60%) y positiva intensa en 2 (40%). No se ha encontrado asociación entre la localización del tumor y la expresión de PD-L1 en las células tumorales.

c) Estadio (enfermedad localizada-EL- versus enfermedad extensa-EE-)

De los 72 pacientes con datos relativos al estadio, en 35 (48,61%) se observó tinción para PD-L1 en células tumorales y en 37 (51,39%) el resultado de dicha tinción fue negativo. De los 35 pacientes con enfermedad localizada (EL), en 16 casos (45,71%) no se observó expresión de PD-L1 en las células tumorales y 19 (54,29%) fueron positivos. Dieciséis (84,21%) de los 19 casos positivos mostraron tinción intensa y en 3 (15,79%) la tinción se describió como débil. Del grupo de 37 pacientes con enfermedad extensa (EE), 21 casos (56,76%) fueron PD-L1 negativo y 16 casos (43,24%) PD-L1+ (15 con tinción intensa y 1 débil). No se encontró asociación entre la EE/EL y la expresión de PD-L1.

d) Estadio T

No se encontró asociación entre el estadio ni la expresión de PD-L1 en las células tumorales.

De los 4 pacientes con estadio Tx se observó positividad intensa para PD-L1 en las células tumorales en 1 caso y los 3 casos restantes fueron negativos.

De los 2 pacientes con estadio T1 se observó ausencia de tinción en 1 y positividad intensa para PD-L1 en 1 caso.

Del grupo de 17 pacientes con estadio T2, 11 (64,71%) mostraron positividad intensa para PD-L1. En 6 pacientes con tumores en estadio T2 (35,29%) la tinción dio resultado negativo.

De los 7 pacientes en estadio T3, en 5 (71,43%) no se observó expresión de PD-L1; en 2 casos (28,57%) la tinción dio resultado positivo intenso

Del grupo de 42 pacientes en estadio T4, 22 (52,38%) fueron negativos en el estudio inmunohistoquímico para PD-L1 en las células tumorales, obteniéndose tinción positiva en 20 (47,62%). De los casos positivos, 16 (80) mostraron tinción intensa y 4 (20%), tinción débil para dicho marcador.

e) Estadio N

De los 7 pacientes con estadio N0, se observó positividad intensa para PD-L1 en 4 casos (57,14%), en 3 casos (42,86%) la tinción fue negativa.

De los 6 pacientes con estadio N1 se observó ausencia de tinción en 5 casos (83,33%) y positividad intensa para PD-L1 en 1 caso (16,67%).

Del grupo de 28 pacientes con estadio N2, 18 (64,29%) fueron positivos para PD-L1 15 (83,33) de ellos con expresión intensa y en 3 casos con tinción débil. En 10 de los pacientes con tumores en estadio N2 (35,71%) la tinción dio resultado negativo.

De los 29 pacientes en estadio N3, en 18 (62,07%) no se observó expresión de PD-L1; en 11 (37,93%) la tinción dio resultado positivo, clasificada como intensa en 10 y débil en 1 caso.

No se encontró asociación entre el estadio N ni la expresión de PD-L1 en las células tumorales.

f) Estadio M

De los 29 pacientes sin evidencia de metástasis (M0), se observó positividad para PD-L1 en 16 casos (55,17%); en 14 de ellos (87,5%), la tinción fue descrita como intensa y en 2 casos débil (12,5%), En 13 casos del grupo M0 (44,83%) la tinción dio resultado negativo.

De los 43 pacientes con metástasis, se observó ausencia de tinción en 24 (55,81%) y positividad para PD-L1 en 19 casos (44,19%); del grupo de pacientes positivos para PD-L1, la tinción se definió como intensa en 17 (85%, 39,53% del total de pacientes con enfermedad metastásica) y débil en 2 casos (15%, 60,47% del total de pacientes con enfermedad metastásica).

No se encontró asociación entre la presencia de metástasis ni la expresión de PD-L1 en las células tumorales.

g) Recidiva

De los 48 pacientes en los que se produjo recidiva tumoral, en 28 (58,33%) la tinción inmunohistoquímica para PD-L1 fue negativa, y en 20 casos (41,67%) la tinción fue positiva mostrando una positividad intensa en 16 muestras (80%) y débil en 4. De los 21 pacientes en los que no se evidenció recidiva o ésta fue clasificada como progresión, en 13 (61,9%) la tinción inmunohistoquímica para PD-L1 en las células tumorales dio resultado positivo, descrita en todos ellos (100%) como intensa, y en 8 casos (38,1%) la tinción fue negativa.

La ausencia de expresión de PD-L1 en las células tumorales, aunque sin alcanzar significación estadística ($p= 0.057$), muestra una tendencia a la asociación con la recidiva tumoral.

h) Localización de la recidiva

El análisis se realizó sobre un total de 42 pacientes con información relativa a los órganos en los que se produjo recidiva (evidencia clínico-radiológica).

De los 6 pacientes con recidiva limitada al pulmón se observó positividad intensa para PD-L1 en 5 casos (83,33%); En 1 caso (16,67%) la tinción dio resultado negativo.

De los 5 pacientes con recidiva pulmonar y en ganglios linfáticos mediastínicos se observó ausencia de tinción en 4 (80%) y positividad para PD-L1 en las células tumorales en 1 caso (20%), clasificada como intensa.

Del grupo de 6 pacientes con recidiva pulmonar y metástasica en un solo órgano a distancia (sin afectación ganglionar mediastínica), 5 (83,33%) fueron positivos para PD-L1 en las células tumorales; de éstos, en 3 casos (60%,) se observó tinción intensa y en 2 casos (40%, la tinción se describió como débil. En 1 caso de este grupo (16,67%) no se observó expresión inmunohistoquímica de PD-L1 en las células tumorales.

De los 3 pacientes con recidiva pulmonar y metástasica en dos o más órganos a distancia (sin afectación ganglionar mediastínica), 2 (66,67%) fueron negativos para PD-L1 en las células tumorales y 1 caso (33,33%) fue positivo intenso.

Del grupo de 4 pacientes con recidiva en pulmón, ganglios linfáticos mediastínicos y un órgano a distancia, en 3 (75%) no se observó expresión de PD-L1 y en 1 caso (25%) la tinción dio resultado positivo, clasificándose como intensa.

En el único paciente en el que se observó recidiva en pulmón, ganglios linfáticos mediastínicos y dos o más órganos a distancia, la tinción para PD-L1 fue negativa.

Del grupo de 13 pacientes en los que la recidiva se presentó como enfermedad metastásica en un único órgano a distancia (distinto a los ganglios linfáticos), 9 casos (69,23%) resultaron negativos y 4 fueron positivos; de éstos, en 3 (75%,) la tinción fue intensa y en 1 caso (25%,) se clasificó como débil.

Del grupo de 4 pacientes en los que la recidiva se presentó como enfermedad metastásica en dos o más órganos a distancia (distintos a los ganglios linfáticos), en 3 (75%) no se observó positividad para PD-L1 en las células tumorales, y en 1 caso (25%) se observó expresión inmunohistoquímica débil de PD-L1.

i) Estado del paciente en el último seguimiento

De los 54 pacientes fallecidos por la enfermedad, en 31 casos (57,41%) la tinción inmunohistoquímica para PD-L1 en las células tumorales dio resultado negativo, y en 23 (42,59%) la tinción fue positiva, 20 de ellos con tinción intensa (86,96%,) y los 3 restantes débil (13,34%,).

De los 8 pacientes vivos en el último seguimiento pero con enfermedad activa, encontramos 6 casos (75%) con tinción inmunohistoquímica positiva para PD-L1, descrita como intensa en 5 (83,33%,) y débil en 1 (16,67%,); en 2 casos (25%) la tinción fue negativa.

Respecto a los 5 pacientes vivos en el último seguimiento y sin evidencia de enfermedad activa, en 3 de ellos (60%) la tinción inmunohistoquímica para PD-L1 dio resultado positivo intenso y en 2 casos (40%) la tinción fue negativa.

2. En los infiltrados inflamatorios asociados al tumor (TILs)

a) Consumo de tabaco, edad, sexo y ECOG

De los 68 pacientes fumadores (activos o ex-fumadores), en 42 (61,76%) la tinción inmunohistoquímica para PD-L1 en los TILs dio resultado positivo; de éstos, en 40 (95,24%,) la tinción fue intensa y en 2 (4,76%) se describió como débil.

No se encontró asociación entre la edad, el sexo ni el ECOG con la expresión de PD-L1 en los TILs.

b) Localización del tumor

El análisis de localización del tumor, localización y estadio TNM se ha realizado sobre un total de 72 pacientes con información disponible sobre los órganos afectados por la neoplasia (evidencia clínico-radiológica).

De los 7 pacientes con afectación pulmonar exclusiva se observó positividad intensa para PD-L1 en 5 casos (71,43%), y en 2 casos (28,57%) la tinción fue negativa.

De los 27 pacientes con afectación pulmonar y de ganglios linfáticos mediastínicos se observó positividad para PD-L1 en los TILs en 17 casos

(62,96%), clasificada como intensa en 15 (88,24%,) y como débil en 2 casos (11,76). Diez de los casos (37.04%) resultaron negativos.

Del grupo de 10 pacientes con afectación pulmonar y metástasis en un solo órgano a distancia, 5 (50%) fueron negativos para PD-L1 en los TILs y 5 casos (50%) fueron positivos para dicho marcador; de éstos, en todos ellos la tinción fue intensa.

En el grupo de pacientes con afectación pulmonar y metástasis en dos o más órganos a distancia, 11 (64,71%) fueron positivos para PD-L1 en los TILs, todos ellos (100%) con tinción intensa; en 6 casos (35,29%) no se observó expresión inmunohistoquímica de dicho marcador.

Respecto al grupo de 6 pacientes con afectación pulmonar y ganglionar mediastínica y metástasis en un órgano a distancia, en 4 (66,67%) se observó positividad intensa para PD-L1 y los 2 casos restantes (33,33%) fueron negativos.

Del grupo de 5 pacientes con afectación pulmonar y ganglionar mediastínica y metástasis en dos o más órganos a distancia, la tinción para PD-L1 en fue negativa en 3 muestras (60%) y positiva intensa en 2 de ellas (40%).

No se encontró asociación entre la localización del tumor y la expresión de PD-L1 en los TILs.

c) Estadio (enfermedad localizada-EL-versus enfermedad extensa-EE-)

44 de los 72 pacientes (61.11%) con datos relativos al estadio, mostraron positividad para PD-L1 en los TILs y 28 casos (38,89%) fueron negativos. De los 44 casos positivos, la tinción fue intensa en 42 (95,45%) y débil en 2 (4,55%).

Dentro del grupo de 35 pacientes con EL en 23 casos (65,71%,) se observó expresión de PD-L1 en los TILs; de éstos, la tinción fue intensa en 21 (86,96) y débil en 3 casos (13,04%,). En este mismo grupo, 12 casos (34,29%,) fueron negativos.

En el grupo de 37 pacientes con EE, en 21 casos (56,76%) se observó expresión intensa de PD-L1 en los TILs y en 16 casos (43,24%) la tinción fue negativa.

No se encontró asociación entre la enfermedad localizada/avanzada y la expresión de PD-L1 en los TILs.

d) Estadio T

De los 4 pacientes con estadio Tx solo 1 caso (25%) mostró positividad intensa para PD-L1 y 3 casos (75%) fueron negativos.

De los 2 pacientes con estadio T1 se observó positividad intensa para PD-L1 en 1 caso (50%) y ausencia de tinción en el caso restante (50%).

Dentro del grupo de 17 pacientes con estadio T2, en 14 (82,35 %) se observó expresión inmunohistoquímica intensa para PD-L1 en los TILs. En 3 pacientes con tumor en estadio T2 (17,65%) la técnica dio resultado negativo.

De los 7 pacientes en estadio T3, en 4 de ellos (57,14 %) no se observó expresión de PD-L1 en los TILs; en 3 casos (42,86%) la tinción dio resultado positivo intenso. Del grupo de 42 pacientes en estadio T4, en 25 (59,52%) se observó expresión del marcador citado en los TILs; de éstos, en 23 (92%,) la tinción fue intensa, y en 2 (8%,) se clasificó como débil.

No se encontró asociación entre el estadio T y la expresión de PD-L1 en los TILs.

e) Estadio N

De los 7 pacientes con estadio N0, se observó positividad intensa para PD-L1 en los TILs en 4 casos (57,14%), y en 3 casos (42,86%) la tinción dio resultado negativo.

De los 6 pacientes con estadio N1 se observó expresión intensa de dicho marcador en los TILs en 4 casos (66,67%), y en 2 casos (33,33%) no se observó expresión inmunohistoquímica de PD-L1.

Del grupo de 28 pacientes con estadio N2, 22 (78,47%) fueron positivos para PD-L1 en los TILs; en 20 (90,91%,) la tinción se describió como intensa y en 2 de ellos (9,09%,) se definió como débil. En 6 de los pacientes con tumores en estadio N2 (21,43%) la tinción dio resultado negativo. De los 29 pacientes en estadio N3, en 16 (55,17%) no se observó expresión de PD-L1 en los TILs; en 13 (44,83%) se encontró una tinción positiva intensa.

No se encontró asociación entre el estadio N y la expresión de PD-L1 en los TILs.

f) Estadio M

De los 29 pacientes sin evidencia de metástasis (M0), se observó positividad para PD-L1 en los TILs en 19 casos (65,52%); en 17 de ellos (89,47%,) la tinción fue descrita como intensa y 2 casos (10,53) mostraron una tinción débil. En 10 casos del grupo M0 (34,48%) no se observó expresión inmunohistoquímica de PD-L1 en los TILs. De los 43 pacientes con metástasis, se observó positividad intensa para PD-L1 en los TILs en 25 casos (58,14%), y negatividad en 18 casos (41,86%).

No se encontró asociación entre la enfermedad metastásica y la expresión de PD-L1 en los TILs.

g) Recidiva

De los 48 pacientes en los que se produjo recidiva tumoral, en 29 (60,42%) la tinción inmunohistoquímica para PD-L1 en los TILs dio resultado positivo, y en 19 casos (39,58%) el resultado fue negativo. De los casos positivos para PD-

L1, en 27 (93,1%), la tinción fue descrita como intensa, y en 2 casos (6,9%) era una expresión débil.

De los 21 pacientes en los que no se evidenció recidiva o ésta fue clasificada como progresión, en 13 (61,9%) la tinción inmunohistoquímica para PD-L1 en los TILs dio resultado positivo intenso, y en 8 casos (38,1%) la tinción fue negativa.

No se encontró asociación entre la recidiva tumoral y la expresión de PD-L1 en los TILs.

h) Localización de la recidiva

El análisis se realizó sobre un total de 42 pacientes con información relativa a los órganos en los que se produjo recidiva (evidencia clínico-radiológica).

Se observó expresión intensa de PD-L1 en los TILs en los 6 pacientes con recidiva limitada al pulmón (100%). De los 5 pacientes con recidiva pulmonar y en ganglios linfáticos mediastínicos, 3 de ellos (60%) fueron PD-L1 positivo intenso y en 2 casos (40%) la tinción dio resultado negativo.

Del grupo de 6 pacientes con recidiva pulmonar y metastásica en un solo órgano a distancia (sin afectación ganglionar mediastínica), 5 (83,33%) fueron positivos para PD-L1 en los TILs; de éstos, en 3 casos (60%,) se observó tinción intensa y en 2 casos (40%,) tinción débil. El caso restante (16,67%) fue negativo para PD-L1. De los 3 pacientes con recidiva pulmonar y metastásica en dos o más órganos a distancia (sin afectación ganglionar mediastínica), 2 (66,67%) fueron negativos para PD-L1 y 1 caso (33,33%) fue positivo intenso. Del grupo de 4 pacientes con recidiva en pulmón, ganglios linfáticos mediastínicos y un órgano a distancia, en 2 (50%) se observó expresión intensa para de PD-L1 en los TILs; en 2 casos (50%) la tinción dio resultado negativo.

En el único paciente en el que se observó recidiva en pulmón, ganglios linfáticos mediastínicos y dos o más órganos a distancia, la tinción para PD-L1 en los TILs fue negativo.

Del grupo de 13 pacientes en los que la recidiva se presentó como enfermedad metastásica en un único órgano a distancia (distinto a los ganglios linfáticos), en 7 (53,85%) se observó expresión intensa de PD-L1 en los TILs, mientras que en 6 casos (46,15%) el estudio inmunohistoquímico fue negativo.

Del grupo de 4 pacientes en los que la recidiva se presentó como enfermedad metastásica en dos o más órganos a distancia (distintos a los ganglios linfáticos), en 1 caso (25%) se observó expresión débil de PD-L1 en los TILs, y en 3 casos (75%) la tinción fue negativa.

No se encontró asociación entre la localización de la recidiva tumoral y la expresión de PD-L1 en los TILs.

i) Estado del paciente en el último seguimiento

De los 54 pacientes fallecidos por la enfermedad, 32 de ellos (59,43%) mostraron expresión de PD-L1 en los TILs, y en 22 casos (40,74%) la tinción resultó ser negativa. De los casos positivos, en 31 la tinción se describió como intensa (96,88%), y 1 caso fue débil (3,12%). De los 8 pacientes vivos en el último seguimiento pero con enfermedad activa, 6 (75%) fueron positivos, 5 (83,33%) de ellos de manera intensa y 1 débil (16,67%); en 2 casos (25%) la tinción fue negativa. De los 5 pacientes vivos en el último seguimiento y sin evidencia de enfermedad activa, en 3 (60%) no se observó expresión inmunohistoquímica de PD-L1 en los TILs; en 2 casos (40%) la tinción fue positiva, intensa.

No se encontró asociación entre el estado del paciente en el último seguimiento y la expresión de PD-L1 en los TILs.

V. Análisis de la tinción inmunohistoquímica de PD-L1 en “células aisladas” en el tumor y en los TILs

Con el objeto de valorar la significación del porcentaje de positividad <1% a la hora de evaluar la expresión de PD-L1 en el CPCP, los porcentajes <1% se consideraron como “positivos en células aisladas”, tanto en los nidos tumorales, “células tumorales PD-L1+ aisladas” como en los TILs asociados al tumor, “TILs PD-L1+ aislados”.

1. Análisis de la tinción de PD-L1 en “células aisladas” en el tumor

Del total de 90 muestras analizadas, en 17 (18,89%) las células tumorales mostraron positividad para PD-L1 en porcentajes inferiores al 1%, y fueron por tanto incluidos en la categoría denominada “células tumorales PD-L1+ aisladas”. Este grupo suponía el 38,64% de los 44 casos en los que se observó tinción inmunohistoquímica para PD-L1 en las células neoplásicas. La tinción de estos casos fue descrita como intensa en 13 (76,47%) y débil en 4 (23,53%). En las “células tumorales PD-L1+ aisladas”, la localización intracelular de la tinción PD-L1 o patrón de tinción PD-L1.

En las “células tumorales PD-L1+ aisladas”, la localización intracelular de la tinción PD-L1 o patrón de tinción PD- predominaba en el citoplasma sobre la membrana en 12 muestras (70,59%) y mostraba similar intensidad en ambos en 5 (29,41%).

En cuanto a su distribución en los nidos tumorales, en 12 muestras (70,59%) éstas aparecían tanto en la periferia como en el centro de los agregados y en 5 (29,41%) únicamente en la periferia de los mismos. De las 12 muestras con presencia de “células tumorales PD-L1+ aisladas” en ambas localizaciones, en 11 (91,67%, 64,71% del total de casos con células tumorales aisladas PD-L1

positivas) se observó que estas aparecían en mayor medida en la zona periférica que en las áreas centrales, mientras que en 1 muestra (8,33%) su distribución era similar.

2. Análisis de la tinción de PD-L1 en “células aisladas” en los TILs

Del total de 90 muestras analizadas, en 11 (12,22%) los infiltrados inflamatorios asociados al tumor mostraron positividad para PD-L1 en porcentajes inferiores al 1%, y fueron por tanto incluidos en la categoría denominada “TILs PD-L1+ aislados”. Este grupo suponía el 24,57% de las 53 muestras en las que se observó tinción inmunohistoquímica para PD-L1 en los TILs y la tinción de estos casos fue descrita como intensa en 9 (81,82%) y débil en 2 (18,18%).

En los “TILs PD-L1+ aislados”, la localización intracelular de la tinción PD-L1 o patrón de tinción PD-L1 predominaba en el citoplasma sobre la membrana en 3 muestras (27,27%), en la membrana sobre el citoplasma en 3 muestras (27,27%) y mostraba similar intensidad en la membrana y en el citoplasma en 5 muestras (45,45%).

Los “TILs PD-L1+ aislados” estaban presentes en el estroma (incluyendo en este concepto tanto el localizado entre unos nidos tumorales y otros, es decir, el denominado “estroma peritumoral” como el situado inmediatamente adyacente a los nidos neoplásicos, esto es, la localización denominada en este estudio “interfase estroma/tumor”) y en los nidos neoplásicos simultáneamente en 2 muestras (18,18%), en el estroma de forma exclusiva en 6 muestras (54,55%) y únicamente en el interior de los nidos neoplásicos en 3 muestras (27,27%). En las 2 muestras en las que se observó presencia simultánea de “TILs PD-L1+ aislados” en el estroma y en el interior de los nidos neoplásicos éstos tendían a localizarse en mayor medida en el estroma inmediatamente adyacente a los nidos tumorales (denominado en este estudio “interfase estroma/tumor”) que en el situado a cierta distancia entre unos agregados y otros (el denominado “estroma peritumoral”), y en ambos en mayor medida que en interior de los nidos neoplásicos (es decir, se ajustaba al patrón decreciente definido como “interfase estroma/tumor>estroma peritumoral>intratumorales”). En este grupo, los “TILs PD-L1+ aislados” se situaron dentro de los nidos neoplásicos de forma similar en la zona central y en la periférica, sin mostrar preferencia por ninguna de ellas. De las 6 muestras de localización exclusiva en el estroma, en 3 (50%) los “TILs PD-L1+ aislados” se localizaban en mayor número en la interfase estroma/tumor que en el estroma peritumoral situado entre los nidos neoplásicos (es decir, se clasificaron en el patrón decreciente definido como “interfase estroma/tumor>estroma peritumoral”) y en 3 muestras (50%) esta distribución se invertía, siendo más numerosas en el estroma peritumoral que en la interfase estroma/tumor (es decir, se incluían en el patrón decreciente definido como “estroma peritumoral>interfase estroma/tumor”). En las 3 muestras con “TILs PD-L1+ aislados” de localización exclusiva en los agregados neoplásicos (sin células PD-L1+ acompañantes en el estroma), éstas

aparecían en número similar en el centro y en la periferia de los nidos tumorales, siendo incluidos en la categoría de localización definida como “intratumorales”. En ninguna de las 11 muestras con “TILs PD-L1+ aislados” se observó coexistencia de células positivas en el estroma y en el tumor con arreglo a la categoría de localización definida por el patrón decreciente “interfase estroma/tumor>intratumorales (periferia)”.

Con respecto al tipo de células inflamatorias en los “TILs PD-L1+ aislados”, en 5 muestras (45,45%) predominaban los linfocitos sobre los macrófagos, en 3 (27,27%) los macrófagos eran más numerosos que los linfocitos y en 3 muestras (27,27%) ambos tipos celulares estaban presentes en proporciones similares.

El porcentaje de linfocitos T CD8+ presentes en los infiltrados inflamatorios asociados al tumor localizados en el estroma era $\leq 29\%$ en el 25% de los casos, $\leq 34\%$ en un 50% de los casos y $\leq 39\%$ en el 75% de los casos. El porcentaje de linfocitos T CD8+ presentes en los TILs localizados en el interior de los nidos neoplásicos era $\leq 3\%$ en el 25% de los casos, $\leq 11\%$ en un 50% de los casos y $\leq 25\%$ en el 75% de los casos.

3. Asociación de la tinción de PD-L1 en “células aisladas” entre el tumor y los TILs

De las 11 muestras en las que se observaron “TILs PD-L1+ aislados”, 2 (18,18%) fueron negativas para dicho marcador en las células tumorales y en 9 muestras (81,82%) se observó expresión inmunohistoquímica de PD-L1 en las células neoplásicas. De las 9 muestras con células tumorales PD-L1+, en 2 (22,22%) la tinción se describió como débil y en 7 casos (77,78%) como intensa.

En relación al patrón de tinción intracelular de las células neoplásicas, de las 9 muestras con células tumorales PD-L1+ y TILs PD-L1+ aislados en 5 de ellas (55,56%) ésta fue de similar intensidad en la membrana y en el citoplasma y en 4 (44,44%) se observó predominio de la tinción citoplasmática sobre la membranosa.

En cuanto a la localización de las células tumorales PD-L1+ en los nidos neoplásicos en estas 9 muestras, en 4 (44,45%) éstas tendían a ser más numerosas en la periferia que en el centro de los agregados; en 3 muestras (33,33%) se observaban únicamente en la periferia de éstos y en 2 muestras (22,22%) aparecían en número similar en la periferia y en el centro de los nidos tumorales.

4. Asociación de variables clínicas con la expresión inmunohistoquímica de PD-L1 en “células aisladas”

4.1. En las células tumorales

No se ha encontrado asociación estadísticamente significativa entre la expresión de PD-L1 en “células aisladas” en el tumor con ninguna de las variables clínicas incluidas en el estudio.

4.2. En los TILs

Al igual que en el apartado anterior, no se ha demostrado asociación con significación estadística entre la expresión de PD-L1 en “células aisladas” en los TILs con ninguna de las variables clínicas incluidas en el estudio.

VI. Estudio de grupos de expresión inmunohistoquímica combinada de PD-L1 en las células tumorales y en los TILs

1. Definición de los grupos

De las 90 muestras evaluadas, en 35 (38,89%) no se observó expresión inmunohistoquímica de PD-L1 en las células tumorales ni en los TILs (grupo T-/I-). En 2 muestras (2,22%) se observó expresión de PD-L1 en las células tumorales pero no en las inflamatorias (grupo T+/I-). En 11 muestras (12,22% del total) no se identificaron células tumorales PD-L1+ pero sí se observó positividad para dicho marcador en los TILs (grupo T-/I+). En 42 casos (46,67%) tanto las células tumorales como los TILs dieron resultado positivo en el estudio inmunohistoquímico de PD-L1 (grupo T+/I+).

2. Asociación de los grupos de expresión combinada de PD-L1 con variables clínicas

a) Consumo de tabaco, edad, sexo y ECOG

En los 68 pacientes fumadores activos o exfumadores, la distribución en grupos fue como sigue: 25 pacientes (36,76%) se incluían en el grupo T-/I-; 1 paciente (1,47%) pertenecía al grupo T+/I-; 10 pacientes (14,71%) correspondían al grupo T-/I+ y 32 pacientes (47,06%) al grupo T+/I+.

No se encontró asociación entre edad, sexo y ECOG con los grupos obtenidos por combinación T/I.

b) Localización del tumor

De los 7 pacientes con afectación pulmonar exclusiva, 1 (14,29%) pertenecía al grupo T-/I-; 1 paciente (14,29%) al grupo T+/I- y 5 pacientes (71,43%) al grupo T+/I+. En este grupo no se encontraron pacientes pertenecientes al grupo T-/I+.

De los 27 pacientes con afectación pulmonar y de ganglios linfáticos mediastínicos, 10 (37,04%) pertenecían al grupo T-/I-; 5 pacientes (18,52%) al grupo T-/I+ y 12 pacientes (44,44%) al grupo T+/I+. En este grupo no se encontraron pacientes pertenecientes al grupo T+/I-.

Del grupo de 10 pacientes con afectación pulmonar y metástasis en un solo órgano a distancia, 5 (50%) pertenecían al grupo T-/I-; 1 paciente (10%) al grupo T-/I+ y 4 pacientes (50%) al grupo T+/I+. En este grupo no se encontraron pacientes pertenecientes al grupo T+/I-.

De los 17 pacientes con afectación pulmonar y metástasis en dos o más órganos a distancia, 6 (35,29%) correspondían al grupo T-/I-; 4 pacientes (23,53%) al grupo T-/I+ y 7 pacientes (41,18%) al grupo T+/I+. En este grupo tampoco se encontraron pacientes pertenecientes al grupo T+/I-.

De los 6 pacientes con afectación pulmonar y ganglionar mediastínica y metástasis en un órgano a distancia, 2 (33,33%) correspondían al grupo T-/I- y 4 pacientes (66,67%) al grupo T+/I+; no se identificaron pacientes que correspondieran al grupo T+/I- ni al grupo T-/I+.

De los 5 pacientes con afectación pulmonar y ganglionar mediastínica y metástasis en dos o más órganos a distancia, 3 (60%) correspondían al grupo T-/I- y 2 pacientes (40%) al grupo T+/I+. En este grupo tampoco se identificaron pacientes que correspondieran al grupo T+/I- ni al grupo T-/I+.

No se encontró una asociación entre los grupos obtenidos por combinación T/I y la localización del tumor

c) Estadio (enfermedad localizada-EL-versus enfermedad extensa-EE-)

De los 35 pacientes con enfermedad localizada (EL), 11 (31,43%) se incluían en el grupo T-/I-; 1 paciente (2,86%) pertenecía al grupo T+/I-; 5 pacientes (14,29%) correspondían al grupo T-/I+ y 18 pacientes (51,43%) al grupo T+/I+.

En el grupo de 37 pacientes con enfermedad extensa (EE), 16 (43,24%) pertenecían al grupo T-/I-; 5 pacientes (13,51%) correspondían al grupo T-/I+ y 16 pacientes (43,24%) al grupo T+/I+. En los casos con enfermedad extensa no se identificaron pacientes correspondientes al grupo T+/I-. No se encontró una asociación entre los grupos obtenidos por combinación T/I y el estadio EE/EL.

d) Estadio T

De los 4 pacientes con estadio Tx, 3 (75%) pertenecían al grupo T-/I y 1 paciente (25%) al grupo T+/I+; en estos pacientes no se identificaron casos correspondientes al grupo T+/I- ni al grupo T-/I+.

De los 2 pacientes con estadio T1, 1 (50%) pertenecía al grupo T-/I- y el segundo paciente (50%) al grupo T+/I+; ningún caso fue clasificado en el grupo T+/I- ni en el grupo T-/I+.

De los 17 pacientes con estadio T2, 3 (17,65%) se incluían en el grupo T-/I-; 3 pacientes (17,65%) correspondían al grupo T-/I+ y 11 pacientes (64,71%) al grupo T+/I+. Entre ellos no se identificaron casos clasificables en el grupo T+/I-.

De los 7 pacientes en estadio T3, 4 (57,14%) se incluían en el grupo T-/I-; 1 paciente (14,29%) correspondía al grupo T-/I+ y 2 pacientes (28,57%) al grupo T+/I+. En estos pacientes tampoco se identificaron casos clasificables en el grupo T+/I-.

Del grupo de 42 pacientes en estadio T4, 16 (38,10%) se incluían en el grupo T-/I-; 1 paciente (2,38%) pertenecía al grupo T+/I-; 6 pacientes (14,29%) correspondían al grupo T-/I+ y 19 pacientes (45,24%) al grupo T+/I+.

No se encontró una asociación entre los grupos obtenidos por combinación T/I y el estadio T.

e) Estadio N

De los 7 pacientes con estadio N0, 2 (28,57%) se incluían en el grupo T-/I-; 1 paciente (14,29%) pertenecía al grupo T+/I-; 1 paciente (14,29%) correspondía al grupo T-/I+ y 3 pacientes (42,86%) al grupo T+/I+.

De los 6 pacientes con estadio N1, 2 (33,33%) se incluían en el grupo T-/I-; 3 pacientes (50%) correspondían al grupo T-/I+ y 1 paciente (16,67%) al grupo T+/I+. Entre ellos no se identificaron casos clasificables en el grupo T+/I-.

Del grupo de 28 pacientes con estadio N2, 6 (21,43%) se incluían en el grupo T-/I-; 4 pacientes (14,29%) en el grupo T-/I+ y 18 pacientes (64,29%) al grupo T+/I+. Entre ellos tampoco se observaron casos pertenecientes al grupo T+/I-.

De los 29 pacientes en estadio N3, 16 (55,17%) pertenecían al grupo T-/I-; 2 pacientes (6,9%) al grupo T-/I+ y 11 pacientes (37,93%) al grupo T+/I+; tampoco se identificaron entre ellos casos clasificables en el grupo T+/I-.

Estadio N	T-/I-	T+/I-	T-/I+	T+/I+	
N0	2	1	1	3	7
N1	2	0	3	1	6
N2	6	0	4	18	28
N3	16	0	2	11	29
	26	1	10	33	70

Pearson chi2 = 23.5038, p= 0.005

Se ha encontrado una asociación estadísticamente significativa entre los grupos obtenidos por combinación T/I y el estadio N (p<0.05).

f) Estadio M

De los 29 pacientes sin evidencia de metástasis (M0), 9 (31,03%) se incluían en el grupo T-/I-; 1 paciente (3,45%) pertenecía al grupo T+/I-; 4 pacientes (13,79%) correspondía al grupo T-/I+ y 15 pacientes (51,72%) al grupo T+/I+.

De los 43 pacientes con metástasis, 18 (41,86% del total de casos con enfermedad metastásica) se incluían en el grupo T-/I-; 6 pacientes (13,95%) correspondía al grupo T-/I+ y 19 pacientes (44,19%) al grupo T+/I+. Entre ellos no se identificaron casos clasificables en el grupo T+/I-.

No se encontró una asociación entre los grupos obtenidos por combinación T/I y la enfermedad metastásica.

g) Recidiva

De los 48 pacientes en los que se produjo recidiva tumoral, 19 (39,58%) se incluían en el grupo T-/I-; 9 pacientes (18,75%) correspondía al grupo T-/I+ y 20 pacientes (41,67%) al grupo T+/I+. Entre los casos con recidiva tumoral documentada no se identificaron pacientes clasificables en el grupo T+/I-.

De los 21 pacientes en los que no se evidenció recidiva o ésta fue clasificada como progresión, 7 (33,33%) pertenecían al grupo T-/I-; 1 paciente (4,76%) al grupo T+/I-; 1 pacientes (4,76%) se incluía en el grupo T-/I+ y 12 pacientes (57,14%) en el grupo T+/I+.

No se encontró una asociación entre los grupos obtenidos por combinación T/I y la recidiva tumoral.

h) Localización de la recidiva

El análisis se realizó sobre un total de 42 pacientes con información relativa a los órganos en los que se produjo recidiva (evidencia clínico-radiológica). De los 6 pacientes con recidiva limitada al pulmón, 1 caso (16,67%) se clasificó en el grupo el grupo T-/I+ y 5 pacientes (83,33%) correspondían al grupo T+/I+; entre estos pacientes no se identificaron casos pertenecientes al grupo T-/I+.

De los 5 pacientes con recidiva pulmonar y en ganglios linfáticos mediastínicos, 2 (40%) se incluían en el grupo T-/I-; 2 pacientes (40%) pertenecían al grupo T-/I+ y 1 paciente (20%) al grupo T+/I+.

Del grupo de 6 pacientes con recidiva pulmonar y metastásica en un solo órgano a distancia (sin afectación ganglionar mediastínica), 1 caso (16,67%) se clasificó en el grupo T-/I- y 5 pacientes (83,33%) correspondían al grupo T+/I+; entre estos pacientes tampoco se identificaron casos pertenecientes al grupo T-/I+.

De los 3 pacientes con recidiva pulmonar y metastásica en dos o más órganos a distancia (sin afectación ganglionar mediastínica), 2 (66,67%) se clasificaron en el grupo T-/I- y 1 paciente (33,33%) en el grupo T+/I+. Al igual que en el

conjunto previo de pacientes, entre ellos no se observaron casos pertenecientes al grupo T-/I+.

Del grupo de 4 pacientes con recidiva en pulmón, ganglios linfáticos mediastínicos y un órgano a distancia, 2 (50%) se incluían en el grupo T-/I-; 1 paciente (25%) se clasificó en el grupo T-/I+ y 1 paciente (25%) en el grupo T+/I+.

El único paciente en el que se observó recidiva en pulmón, ganglios linfáticos mediastínicos y dos o más órganos a distancia pertenecía al grupo T-/I-.

Del grupo de 13 pacientes en los que la recidiva se presentó como enfermedad metastásica en un único órgano a distancia (distinto a los ganglios linfáticos), 6 (46,15%) se clasificaron en el grupo T-/I-; 3 pacientes (23,08%) en el grupo T-/I+ y 4 pacientes (30,77%) en el grupo T+/I+.

Del grupo de 4 pacientes en los que la recidiva se presentó como enfermedad metastásica en dos o más órganos a distancia (distintos a los ganglios linfáticos), 3 (75%) se incluían en el grupo T-/I- y 1 paciente (25%) pertenecía al grupo T+/I+; entre ellos no se observaron casos pertenecientes al grupo T-/I+.

No se encontró una asociación entre los grupos obtenidos por combinación T/I y la localización de la recidiva tumoral.

i) Estado del paciente en el último seguimiento

De los 54 pacientes fallecidos por la enfermedad, 22 (40,74%) pertenecían al grupo T-/I-; 9 pacientes (16,67%) correspondían al grupo T-/I+ y 23 pacientes (42,59%) se clasificaron en el grupo T+/I+. Entre los pacientes fallecidos no se encontraron casos pertenecientes al grupo T+/I-.

De los 8 pacientes vivos en el último seguimiento pero con enfermedad activa, 2 (25%) se incluían en el grupo T-/I- y 6 pacientes (75%) al grupo T+/I+; no se observaron casos clasificables en el grupo T-/I+ ni en el grupo T+/I-.

De los 5 pacientes vivos en el último seguimiento y sin evidencia de enfermedad activa, 2 (40%) pertenecían al grupo T-/I-; 1 paciente (20%) al grupo T+/I- y 2 pacientes (40%) en el grupo T+/I+. Entre los pacientes vivos sin evidencia de enfermedad no se identificaron casos pertenecientes al grupo T-/I+.

Estado en el último seguimiento	T-/I-	T+/I-	T-/I+	T+/I+	
Muerte por enfermedad	22	0	9	23	54
Vivo con enfermedad	2	0	0	6	8
Vivo sin enfermedad	2	1	0	2	5
	26	1	9	31	67

Pearson chi2 = 16.6410, p= 0.011

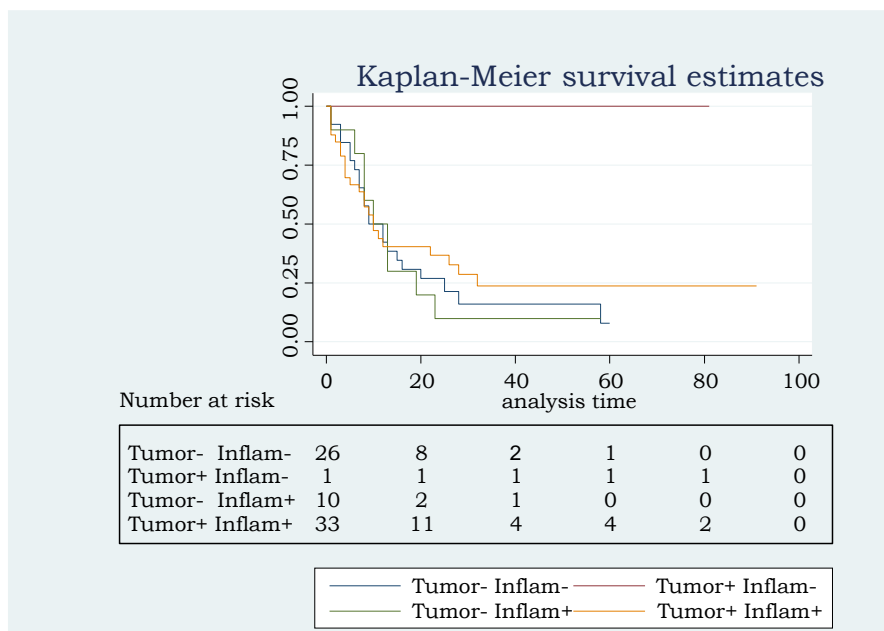
Se ha encontrado una asociación estadísticamente significativa entre los grupos obtenidos por combinación T/I y el estado del paciente en la última consulta.

3. Análisis de la supervivencia global y del intervalo libre de enfermedad según grupos de expresión combinada de PD-L1 en las células tumorales y en los TILs

El análisis se realizó sobre los grupos de expresión combinada de PD-L1 definidos previamente: T-/I-, T+/I-, T-/I+ y T+/I+.

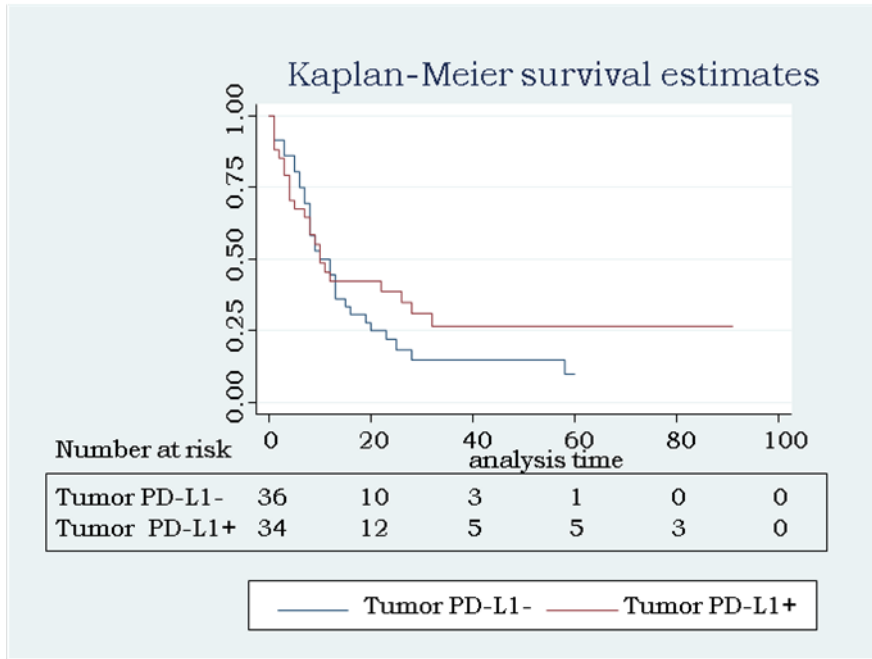
3.1 Supervivencia global

De los 35 casos incluidos en el grupo T-/I- (38,89% del total) la supervivencia a los 12 meses fue del 50%, (IC 95% 29,91-67,16%p=0,95) y a los 24 meses del 26,92%, con un intervalo de confianza del (IC 95% 11,93-44,49%, p=0,95). De los 2 casos pertenecientes grupo T+/I- únicamente en uno de ellos se dispuso de datos relativos a la supervivencia; este caso se encontraba vivo en el momento del último seguimiento. De los 11 casos incluidos en el grupo T-/I+ (12,22% del total) la supervivencia a los 12 meses fue del 50% (IC 95% 18,36-75,32%p=0,95) y a los 24 meses del 10%, (IC 95% 0,57-35,81%p=0,95). De los 42 casos pertenecientes al grupo T+/I+ (46,67% del total) la supervivencia a los 12 meses fue del 43,62%, (IC 95% 26,15-59,87%p=0,95) y a los 24 meses del 36,43%, (IC 95% 19,98-53,09%p=0,95). Los resultados según curvas de Kaplan-Meier quedan reflejados en la gráfica siguiente:



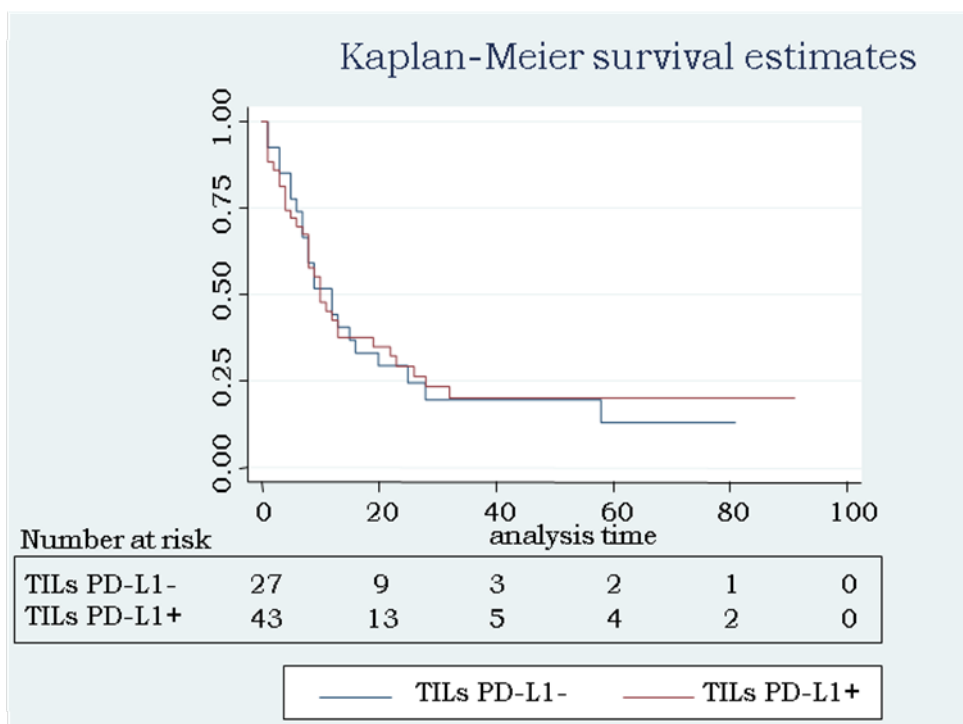
p=0,4882

El análisis se realizó además sobre el total de casos con células tumorales PD-L1+ (que englobaría los grupos T+/I- y T+/I+) frente a los casos sin expresión de PD-L1 en las células tumorales (que incluirían los pertenecientes a los grupos T-/I- y T-/I+). La supervivencia global a los 12 meses del grupo con células tumorales PD-L1+ fue del 45,37%, (IC 95% 27,92-61,96%, $p=0,95$) y a los 24 meses del 38,47%, (IC 95% 21,90-54,83%, $p=0,95$). La supervivencia a los 12 meses del grupo con células tumorales PD-L1- fue del 44,44%, (IC 95% 28,02-59,64% $p=0,95$) y a los 24 meses del 21,88%, (IC 95% 10,12-36,48%, $p=0,95$). Los resultados según curvas de Kaplan-Meier se reflejan en la gráfica siguiente:



$p=0,3219$

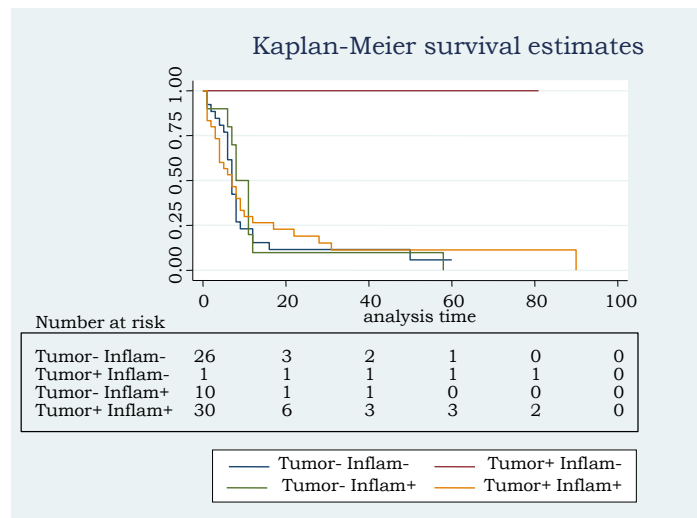
Este mismo análisis se realizó sobre el total de casos con células PD-L1+ en los infiltrados inflamatorios asociados al tumor (que englobaría los grupos T+/I+ y T-/I+) frente a los casos sin expresión de PD-L1 en los TILs (que incluirían los pertenecientes a los grupos T-/I- y T+/I-). La supervivencia global a los 12 meses del grupo con células inflamatorias PD-L1+ fue del 45,08%, (IC 95% 29,64-59,33% $p=0,95$) y a los 24 meses del 29,17%, (IC 95% 16,01-43,67%, $p=0,95$). La supervivencia a los 12 meses del grupo con TILs PD-L1- fue del 44,44%, (IC 95% 25,56-61,65% $p=0,95$) y a los 24 meses del 29,63%,(IC 95% 14,06-47,03% $p=0,95$). Los resultados según curvas de Kaplan-Meier se reflejan en la gráfica siguiente:



p=0,8514

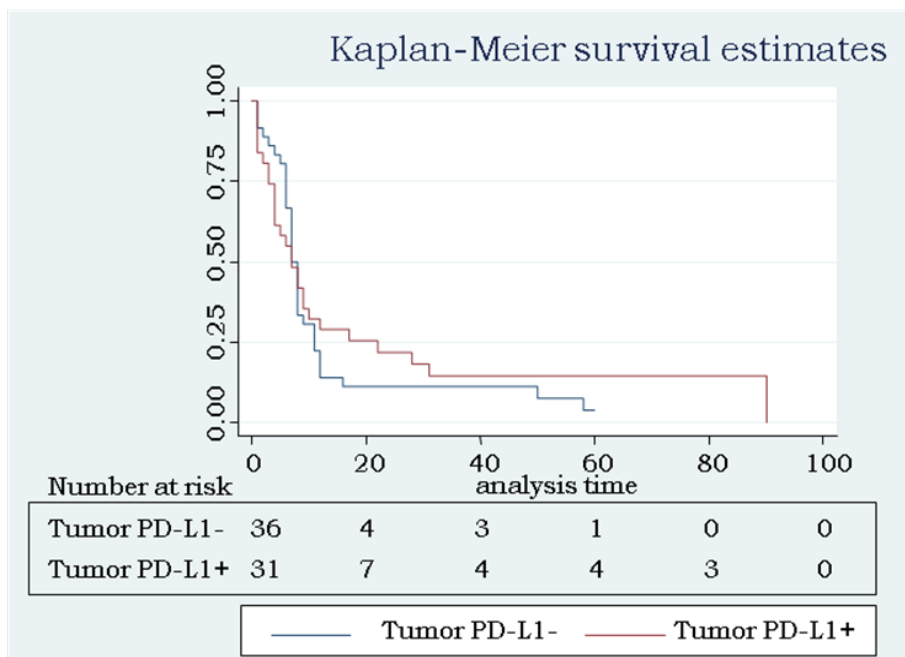
3.2. Supervivencia libre de enfermedad

De los 35 casos incluidos en el grupo grupo T-/I- (38,89% del total) la supervivencia libre de enfermedad a los 12 meses fue del 23,08%, (IC 95% 9,38-40,31% $p=0,95$) y a los 24 meses del 11,54%, (IC 95% 2,92-26,74%, $p=0,95$). De los 2 casos pertenecientes grupo T+/I- únicamente en uno de ellos se dispuso de datos relativos a la supervivencia libre de enfermedad; este caso se encontraba vivo en el momento del último seguimiento. De los 11 casos incluidos en el grupo T-/I+ (12,22% del total) la supervivencia libre de enfermedad a los 12 meses fue del 20%, (IC 95% 3,09-47,47%, $p=0,95$) y a los 24 meses del 10%, (IC 95% 0,57-35,81%, $p=0,95$). De los 42 casos pertenecientes al grupo T+/I+ (46,67% del total) la supervivencia libre de enfermedad a los 12 meses fue del 26,67%, (IC 95% 12,61-43,01% $p=0,95$) y a los 24 meses del 19,05%, (IC 95% 7,31-34,96% $p=0,95$). Los resultados según curvas de Kaplan-Meier quedan reflejados en la gráfica siguiente:



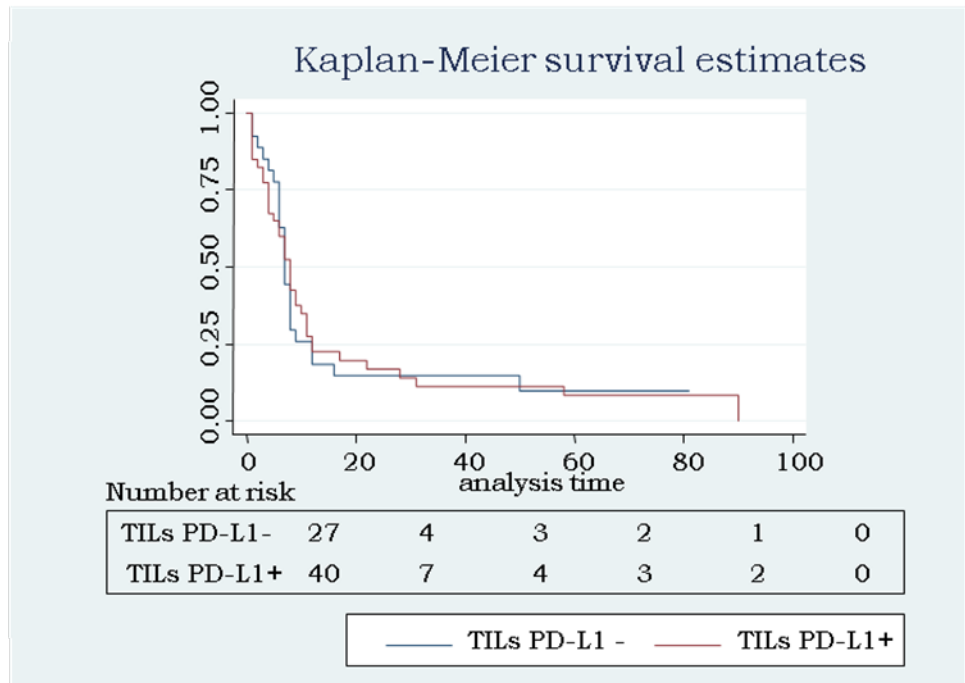
p=0,4131

El análisis se realizó además sobre el total de casos con células tumorales PD-L1+ (que englobaría los grupos T+/I- y T+/I+) frente a los casos sin expresión de PD-L1 en las células tumorales (que incluirían los pertenecientes a los grupos T-/I- y T-/I+). La supervivencia libre de enfermedad a los 12 meses del grupo con células tumorales PD-L1+ fue del 29,03%, (IC 95% 14,52-45,27% $p=0,95$) y a los 24 meses del 21,77%, (IC 95% 9,24-37,70%, $p=0,95$). La supervivencia libre de enfermedad a los 12 meses del grupo con células tumorales PD-L1- fue del 22,22%, (IC 95% 10,46-36,72% $p=0,95$) y a los 24 meses del 11,11%, (IC 95% 3,52-23,62%, $p=0,95$). Los resultados según curvas de Kaplan-Meier se reflejan en la gráfica siguiente:



p=0,5469

Este mismo análisis se realizó sobre el total de casos con células PD-L1+ en los TILs (que englobaría los grupos T+/I+ y T-/I+) frente a los casos sin expresión de PD-L1 en los TILs (que incluirían los pertenecientes a los grupos T-/I- y T+/I-). La supervivencia libre de enfermedad a los 12 meses del grupo TILs PD-L1+ fue del 27,50%, (IC 95% 14,86-41,72% $p=0,95$) y a los 24 meses del 16,88%, (IC 95% 7,15-30,11% , $p=0,95$). La supervivencia libre de enfermedad a los 12 meses del grupo con TILs PD-L1- fue del 18,52%, (IC 95% 6,75-34,82% $p=0,95$) y a los 24 meses del 14,81%,(IC 95% 4,66-30,45% ($p=0,95$). Los resultados según curvas de Kaplan-Meier se reflejan en la gráfica siguiente:



VII. Análisis de la tinción inmunohistoquímica de PD-L1 en las células tumorales y en los TILs según los intervalos recogidos por IASLC para el clon SP142 (Ventana®)

1. Definición de las categorías

Siguiendo las especificaciones recogidas en la guía recientemente publicada por la IASLC (Tsao 2017) para la valoración inmunohistoquímica en CPNCP del clon anti-PD-L1 (SP142, Ventana®), las 90 muestras de la serie se distribuyeron en grupos con arreglo a los porcentajes de células PD-L1+ identificadas tanto en las células tumorales como en los TILs, definiendo un total de 8 categorías: 4 para la valoración de PD-L1 en las células tumorales y 4 para la valoración de dicho marcador en los TILs. Las categorías quedan

definidas en dicha guía por los siguientes intervalos porcentuales de células PD-L1+:

a) En las células tumorales:

-TC0: <1%.

-TC1: entre el 1% y <5%.

-TC2: entre el 5% y <50%.

-TC3: ≥50%.

b) En los infiltrados inflamatorios asociados al tumor:

-IC0: <1%.

-IC1: entre el 1% y <5%.

-IC2: entre el 5% y <10%.

-IC3: ≥10%.

2. Análisis en las células tumorales

2.1. Resultados numéricos globales

Del total de 90 muestras analizadas, 63 (70%) se incluyeron en la categoría TC0. Esta categoría incluía tanto los casos en los que se identificaron células tumorales PD-L1+ en porcentajes < 1% como los 46 casos del estudio en los que no se observó expresión inmunohistoquímica de PD-L1 en las células tumorales. Cuatro casos de la serie (4,44%) se incluyeron en la categoría TC1, 19 casos (21,11%) en la categoría TC2 y en 4 casos (4,44%) el porcentaje fue ≥50% por lo que se incluyeron en la categoría TC3.

2.2. Relación de las categorías TC con la intensidad de tinción de PD-L1 en las células tumorales

La categoría TC0 de la serie, según se ha descrito previamente, incluía también los 46 casos del estudio en los que no se observó expresión inmunohistoquímica de PD-L1 en las células tumorales; excluidos éstos, de los 17 casos restantes del grupo TC0, la tinción de PD-L1 en las células tumorales fue descrita como intensa en 13 (76,74% de los 17 casos TC0 con expresión de PD-L1 y como débil en 4 (23,53% de los 17 casos TC0 con expresión de PD-L1). De los 4 casos incluidos en la categoría TC1, en 3 (75%) la tinción se describió como intensa y en 1 (25%) como débil. Todos los casos de la categoría TC2 (19) y TC3 (4) mostraron tinción intensa.

Tinción de PD-L1 en las células tumorales	TC0 <1%	TC1 [≥1% <5%]	TC2 [≥5% <50%]	TC3 ≥50%	
Ausente	46	0	0	0	46
Débil	4	1	0	0	5
Intensa	13	3	19	4	39
	63	4	19	4	90

Pearson chi2 = 49.2454, p= 0.000

Se ha encontrado una asociación estadísticamente significativa entre la intensidad de la tinción de PD-L1 y el porcentaje de células tumorales positivas ($p<0.001$). Los casos con mayor porcentaje de células tumorales PD-L1 positivas (TC2 y TC3) muestran una expresión intensa del marcador.

2.3. Relación de las categorías TC con el patrón de tinción intracelular de PD-L1 en las células tumorales

De los 17 casos de la categoría TC0 con presencia de células tumorales PD-L1+, en 12 muestras (70,59%) se observó predominio de la tinción citoplasmática sobre la membrana y en 5 casos (29,41%) la tinción fue similar en ambas localizaciones. En todos los casos (4) incluidos en la categoría TC1 se observó predominio de la tinción citoplasmática sobre la membrana. De los 19 casos incluidos en la categoría TC2, en 13 (68,42%) se observó similar intensidad de tinción en la membrana y en el citoplasma y en 6 casos (31,58%) predominaba la tinción citoplasmática sobre la membrana. De los 4 casos de la categoría TC3, 2 (50%) mostraban tinción de similar intensidad en la membrana que en el citoplasma y en 2 casos (50%) se observó predominio de la tinción citoplasmática sobre la membrana.

2.4. Relación de las categorías TC con la localización de las células tumorales PD-L1+ en los nidos neoplásicos

De los 17 casos de la categoría TC0 con presencia de células tumorales PD-L1+, en 11 (64,71%), las células tumorales PD-L1+ se ajustaban al patrón decreciente “periferia>centro de los nidos tumorales”; en 1 caso (5,88%) aparecían en cuantía similar tanto en la zona periférica como en el centro de los agregados neoplásicos y en 5 casos (29,41%) se identificaban únicamente en la periferia de los nidos tumorales.

De los 4 casos incluidos en la categoría TC1, en 3 (75%) las células tumorales PD-L1+ eran más numerosas en la periferia que en el centro de los) y en 1 caso (25%) aparecían únicamente en la zona periférica de los nidos neoplásicos.

De los 19 casos incluidos en la categoría TC2, en 16 (84,21%) las células tumorales PD-L1+ se ajustaban al patrón decreciente “periferia>centro de los nidos tumorales”, en 2 casos (10,53%) aparecían en ambas localizaciones en cuantía similar y en 1 caso (25%) se identificaban únicamente en la zona periférica de los nidos neoplásicos.

De los 4 casos de la categoría TC3, en 3 (75%) las células PD-L1+ se observaban tanto en la zona periférica de los nidos como en las áreas centrales, y en ambas en cuantía similar, y en 1 caso (25%) mostraba un patrón decreciente “periferia>centro de los nidos tumorales”.

El patrón mayoritario de tinción independientemente del grupo TC fue predominante en la periferia sobre el centro de los nidos neoplásicos.

2.5. Relación de las categorías TC con la expresión de PD-L1 en los TILs

De los 63 casos pertenecientes a la categoría TC0, en 27 (42,86%) se observó la presencia concomitante de células PD-L1+ en los TILs, mientras que en 36 casos (57,14%) fue negativa. De los 27 casos con TILs PD-L1+, en 24 (88,89%) la tinción se describió como intensa y en 3 casos (11,11%,) como débil.

En los 4 casos de la categoría TC1 se observó la tinción intensa de células PD-L1+ en los TILs.

De los 19 casos de la categoría TC2, en 18 (94,74%) se identificaron células PD-L1+ en los TILs, y 1 caso (5,26%) fue negativo.

Los 4 casos de la categoría TC3 fueron positivos para PD-L1 de manera intensa.

2.6. Relación de las categorías TC con el patrón de tinción intracelular de PD-L1 en los TILs

De los 27 casos pertenecientes a la categoría TC0 en los que se observó presencia asociada de células PD-L1+ en los TILs, en 14 (51,85%) la tinción para dicho marcador en las células inflamatorias eran más intensa en la membrana que en el citoplasma, en 7 (25,93%) predominaba la tinción citoplasmática sobre la membranosa y en 6 casos (22,22%,) la intensidad de tinción era similar en ambas localizaciones intracelulares.

De los 4 casos de la categoría TC1 en 2 (50%) los TILs mostraban tinción más intensa de PD-L1 en el citoplasma que en la membrana y en 2 casos (50%) la intensidad de tinción era mayor en la membrana que en el citoplasma.

De los 18 casos de la categoría TC2 en los que se observó expresión de PD-L1 en los TILs, en 10 (55,56%,) predominaba la tinción membranosa sobre la citoplasmática, en 5 (27,77%) la intensidad de tinción en ambas localizaciones era similar y en 3 (16,67%) predominaba la tinción del citoplasma.

De los 4 casos de la categoría TC3, en 2 muestras (50%) los TILs tenían la misma intensidad de tinción de la membrana y del citoplasma, en 1 (25%) la intensidad de tinción era mayor en la membrana y en el restante (25%) predominaba la tinción del citoplasma.

Patrón de tinción intracelular en los TILs	TC0 <1%	TC1 [≥1% <5%]	TC2 [≥5% <50%]	TC3 ≥50%	
Ausente	36	0	1	0	37
Membrana=citoplasma	6	0	5	2	13
Citoplasma<membrana	14	2	10	1	27
Citoplasma>membrana	7	2	3	1	13
	63	4	19	4	90

El patrón de tinción intracelular de los TILs muestra un predominio de tinción de membrana sobre citoplasma independientemente del grupo TC.

2.7. Relación de las categorías TC con la composición de los TILs

De las 27 muestras de la categoría TC0 en los que se observó expresión de PD-L1 en los TILs, en 15 (55,56%,) predominaban los macrófagos sobre los linfocitos; en 7 (25,93%) los linfocitos eran más numerosos que los macrófagos y en 5 casos (18,51%) ambos tipos celulares aparecían en proporciones similares.

De las 4 muestras pertenecientes a la categoría TC1, en 3 de ellas (75%) los linfocitos eran más numerosos que los macrófagos, y en 1 caso (25%) ambos aparecían en similar cuantía.

De las 18 muestras de la categoría TC2 en las que se identificaron células inflamatorias PD-L1+ en los TILs, en 8 (44,45%,) los macrófagos eran más numerosos que los linfocitos, en 6 (33,33%) la relación se invertía, siendo más abundantes los linfocitos que los macrófagos, y en 4 muestras (22,22%) se observaba un número similar de linfocitos y de macrófagos en los TILs.

De las 4 muestras correspondientes a la categoría TC3, en 2 (50%) predominaban los linfocitos sobre los macrófagos, en 1 (25%) eran más numerosos los macrófagos y en 1 muestra (25%) ambos tipos celulares aparecían en similar cuantía.

Composición de los TILs	TC0 <1%	TC1 [≥1% <5%]	TC2 [≥5% <50%]	TC3 ≥50%	
Ausente	36	0	1	0	37
Macrófagos=linfocitos	5	1	4	1	11
Macrófagos>linfocitos	15	0	8	1	24
Macrófagos<linfocitos	37	3	6	2	18
	63	4	19	4	90

Se observa un predominio de macrófagos respecto de linfocitos en la composición de los TILs cuando las muestras se agrupan en función de las categorías TC.

2.8. Relación de las categorías TC con la localización de los TILs

De los 27 casos del grupo TC0 con células PD-L1+ en los TILs, en 14 casos (51,85%,) los TILs eran positivos solo en el estroma con la siguiente distribución: 8 (con patrón estroma peritumoral>estroma/tumor y 6 muestras mostraban un patrón de expresión “interfase estroma/tumor>estroma peritumoral”.

Once de los casos (40,74%) presentaban una tinción simultanea en estroma peritumoral e interfase estroma/tumor” y en los nidos neoplásicos, Nueve de ellos (con patrón interfase estroma/tumor>estroma peritumoral>intratumorales”;

En 2 de las muestras (7,41%) los TILs PD-L1+ aparecían exclusivamente en el interior de los nidos neoplásicos.

De los 4 casos pertenecientes a la categoría TC1, en el 50% de los casos se encontraba tinción en el estroma (con patrón interfase estroma/tumor) y en los nidos neoplásicos simultáneamente, y en la mitad restante en el estroma de forma exclusiva.

De los 18 casos pertenecientes a la categoría TC2 en los que se observó expresión inmunohistoquímica de PD-L1 en los TILs, en 11 (61,11%) las células inflamatorias PD-L1+ estaban presentes en el estroma y en los nidos neoplásicos con un patrón mayoritario interfase estroma/tumor>estroma peritumoral>intratumorales, en 5 casos (27,78%) en el estroma de forma exclusiva con un patrón mayoritario (4 casos) interfase estroma/tumor>estroma peritumoral, y en 2 casos (11,11%) los TILs PD-L1+ aparecían exclusivamente en el interior de los nidos neoplásicos.

De los 4 casos pertenecientes a la categoría TC3, en 3 de ellos (75%) los TILs PD-L1+ estaban presentes en el estroma con un patrón interfase estroma/tumor>estroma peritumoral>intratumorales y en los nidos neoplásicos simultáneamente, y en 1 caso (25%) en el estroma de forma exclusiva.

Las muestras que presentaban TILs PD-L1+ situadas dentro de los nidos neoplásicos aparecían en cuantía similar en la zona central y en la periférica de los agregados, independientemente del grupo TC al que pertenecieran.

2.9. Relación de las categorías TC con el porcentaje de linfocitos T CD8+ en los TILs

En los 17 casos de la categoría TC0 con células tumorales PD-L1+, el porcentaje de linfocitos T CD8+ en los TILs localizados en el estroma era $\leq 16\%$ en el 25% de los casos, $\leq 27\%$ en un 50% de los casos y $\leq 38\%$ en el 75% de los casos. El porcentaje de linfocitos T CD8+ presentes en los TILs localizados en el interior de los nidos neoplásicos era $\leq 1\%$ en el 25% de los casos, $\leq 6\%$ en un 50% de los casos y $\leq 19\%$ en el 75% de los casos.

En los 4 casos de la categoría TC1, el porcentaje de linfocitos T CD8+ en los TILs localizados en el estroma era $\leq 39\%$ en el 25% de los casos, $\leq 51,5\%$ en un 50% de los casos y $\leq 69,5\%$ en el 75% de los casos. El porcentaje de linfocitos T CD8+ presentes en los TILs localizados en el interior de los nidos neoplásicos era $\leq 33\%$ en el 25% de los casos, $\leq 57,5\%$ en un 50% de los casos y $\leq 64,5\%$ en el 75% de los casos.

En los 19 casos de la categoría TC2, el porcentaje de linfocitos T CD8+ en los TILs localizados en el estroma era $\leq 28\%$ en el 25% de los casos, $\leq 41\%$ en un 50% de los casos y $\leq 52\%$ en el 75% de los casos. El porcentaje de linfocitos T CD8+ presentes en los TILs localizados en el interior de los nidos neoplásicos era $\leq 6\%$ en el 25% de los casos, $\leq 12\%$ en un 50% de los casos y $\leq 40\%$ en el 75% de los casos.

En los 4 casos de la categoría TC3, el porcentaje de linfocitos T CD8+ en los TILs localizados en el estroma era $\leq 27\%$ en el 25% de los casos, $\leq 33\%$ en un 50% de los casos y $\leq 39,5\%$ en el 75% de los casos. El porcentaje de linfocitos T CD8+ presentes en los TILs localizados en el interior de los nidos neoplásicos era $\leq 16,5\%$ en el 25% de los casos, $\leq 22\%$ en un 50% de los casos y $\leq 33\%$ en el 75% de los casos.

Por lo tanto, encontramos un predominio de linfocitos T CD8+ localizados en el estroma sobre los localizados en el interior de los nidos tumorales, independientemente del grupo TC. La distribución de células CD8+ localizadas en el estroma se asocia de manera significativa con el porcentaje de células tumorales PD-L1+ que hay en el tumor (Test de Kruskal-Wallis, $p = 0.0081$).

3. Análisis en los infiltrados inflamatorios asociados al tumor (TILs)

3.1. Resultados numéricos globales

Del total de 90 muestras analizadas en el estudio, en 48 de ellas (53.33%) se identificaron TILs PD-L1+ en porcentajes inferiores al 1%, y fueron por tanto incluidos en la categoría IC0. La distribución de los casos según las categorías fue: 4 casos de la serie (4,44%) en IC1, 11 casos (12,22%), en IC2, y 27 casos (30%) en IC3.

3.2. Relación de las categorías IC con la intensidad de tinción de PD-L1 en los TILs

En la categoría IC0 de la serie se incluyen los 37 casos del estudio en los que no se observó ninguna expresión inmunohistoquímica de PD-L1 en los TILs y 11 casos con expresión $< 1\%$. En estos 11 casos la tinción de PD-L1 en los TILs fue intensa en 9 (81,82%) y débil en 2 (18,18%). Los 4 casos de la categoría IC1 mostraron tinción intensa. De los 11 casos pertenecientes a la categoría IC2, en 10 (90,91%) se observó tinción intensa y en 1 (9,09%) tinción débil. Todos los casos (27) incluidos en la categoría IC3 mostraron tinción intensa.

La expresión de PD-L1 en los TILs es en su mayoría una tinción intensa, encontrando sólo 2 casos de tinción débil en la categoría IC0.

3.3. Relación de las categorías IC con el patrón de tinción intracelular de PD-L1 en los TILs

De las 11 muestras del grupo IC0 con células PD-L1+ en los TILs, en 5 (45,46%) se observó tinción de similar intensidad en la membrana y en el citoplasma; en 3 casos (27,27%) predominaba la tinción membranosa y en 3 casos (27,27%) se observó mayor intensidad de tinción en el citoplasma. De los 4 casos incluidos en la categoría IC1, en 2 (50%) era más intensa la tinción membranosa que la citoplasmática, en 1 caso (25%) predominaba la tinción del citoplasma y en 1 caso se observó similar intensidad de tinción. De los 11 casos pertenecientes a la categoría IC2, en 5 (45,45%) la tinción membranosa predominaba sobre la citoplasmática, en 4 casos (36,36%) se observó mayor intensidad de tinción en el citoplasma y en 2 casos (18,18%) la intensidad de tinción fue similar en ambas localizaciones. De los 27 casos incluidos en la categoría IC3, en 17 (62,96%) se observó mayor intensidad de tinción en la membrana, en 5 casos (18,52%) era mayor la tinción citoplasmática y en 5 casos (18,52%) la intensidad de tinción fue similar en la membrana y en el citoplasma.

El patrón de tinción intracelular de los TILs muestra un predominio de tinción de membrana sobre citoplasma independientemente del grupo IC.

3.4. Relación de las categorías IC con la localización de los TILs en el tejido neoplásico

De los 11 casos del grupo IC0 con células PD-L1+ en los TILs, en 2 (18,18%), estas células estaban presentes en el estroma y en los nidos neoplásicos simultáneamente, en el estroma de forma exclusiva en 6 casos (54,55%) y únicamente en el interior de los nidos neoplásicos en 3 casos (27,27%). En los 2 casos de la categoría IC0 en los que se observó presencia simultánea de células PD-L1+ en el estroma y en el interior de los nidos neoplásicos, el patrón era “interfase estroma/tumor>estroma peritumoral>intratumorales”. En este grupo, las células PD-L1+ situadas dentro de los nidos neoplásicos aparecían en cuantía similar en la zona central y en la periférica de los agregados, sin mostrar preferencia por ninguna de ellas. De los 6 casos de localización exclusiva en el estroma, en 3 (50%), los TILs PD-L1+ mostraban un patrón interfase estroma/tumor>estroma peritumoral y en 3 casos (27,27%) esta distribución se invertía, siendo más numerosas en el estroma peritumoral que en la interfase estroma/tumor. En los 3 casos con TILs PD-L1+ de localización exclusiva en los agregados neoplásicos, éstas aparecían en número similar en el centro y en la periferia de los nidos tumorales,

De los 4 casos incluidos en la categoría IC1, en 2 (50%) los TILs PD-L1+ estaban presentes en el estroma y en los nidos neoplásicos simultáneamente, y en 2 casos (50%) en el estroma de forma exclusiva; De los 2 casos en los que se observó presencia simultánea de TILs PD-L1+ en el estroma y en el interior

de los nidos neoplásicos, en 1 caso el patrón de tinción era interfase estroma/tumor>estroma peritumoral>intratumorales; además, en este mismo caso los TILs PD-L1+ situados dentro de los nidos neoplásicos aparecían en cuantía similar en la zona central y en la periférica. En el segundo caso de este grupo la expresión de TILs PD-L1+ era mayor en el estroma que en el interior de los nidos tumorales con un patrón interfase estroma/tumor>intratumorales (periferia). Los 2 casos de la categoría IC1 con células PD-L1+ de localización estromal exclusiva mostraron un patrón de expresión “interfase estroma/tumor>estroma peritumoral”.

De los 11 casos pertenecientes a la categoría IC2, en 2 (18,18%) los TILs PD-L1+ estaban presentes en el estroma y en los nidos neoplásicos simultáneamente, y en 9 casos (81,82%) en el estroma de forma exclusiva; en esta categoría no se observaron casos con TILs PD-L1+ exclusivamente en el interior de los nidos neoplásicos. En los 2 casos del grupo en los que se observó presencia simultánea de TILs PD-L1+ en el estroma y en el interior de los nidos neoplásicos, éstas mostraban un patrón interfase estroma/tumor>estroma peritumoral>intratumorales; apareciendo en cuantía similar en la zona central y en la periférica de los agregados. De los 9 casos de la categoría IC2 con células PD-L1+ de localización estromal exclusiva, en 6 (66,67) éstas eran más numerosas en el estroma yuxtatumoral que en el localizado entre unos nidos neoplásicos y otros y en 3 casos (33,33) la relación se invertía, ajustándose por tanto al patrón de expresión “estroma peritumoral> interfase estroma/tumor”.

De los 27 casos pertenecientes a la categoría IC3, en 21 (77,78%) los TILs PD-L1+ estaban presentes en el estroma y en los nidos neoplásicos simultáneamente; en 5 casos (18,52%) en el estroma de forma exclusiva; y en 1 caso (3,7%) únicamente en los nidos neoplásicos. De los 21 casos del grupo en los que se observó presencia simultánea de células inflamatorias PD-L1+ en el estroma y en el interior de los nidos neoplásicos, en 18 (85,71%) se ajustaban al patrón definido como “interfase estroma/tumor>estroma peritumoral>intratumorales” apareciendo en cuantía similar en la zona central y en la periférica de los agregados. En los 3 casos restantes del grupo de coexpresión estroma+tumor (14,29%,) la expresión de TILs PD-L1+ era mayor en el estroma que en el interior de los nidos tumorales, con un patrón de tinción “interfase estroma/tumor>intratumorales (periferia)”. De los 5 casos de la categoría IC3 con células PD-L1+ de localización estromal exclusiva, en 3 (60%) el patrón de expresión fue “interfase estroma/tumor>estroma peritumoral”) y en 2 casos (40) la relación se invertía, ajustándose por tanto al patrón de expresión “estroma peritumoral> interfase estroma/tumor”). En 1 caso de la categoría IC3 (3,70%) se observó localización intratumoral exclusiva de las células inflamatorias PD-L1+.

La localización de los TILs PD-L1+ mostró un patrón mayoritario “interfase estroma/tumor>estroma peritumoral”, independientemente del grupo IC.

Localización de los infiltrados inflamatorios asociados al tumor (TILs)	IC0 <1%	IC1 [≥1% <5%]	IC2 [≥5% <10%]	IC3 ≥10%	
Ausente	37	0	0	0	37
Interfase estroma/tumor>estroma peritumoral>intratumorales	2	1	2	18	23
Estroma peritumoral>interfase estroma/tumor	3	0	3	3	9
Interfase estroma/tumor>estroma peritumoral	3	2	6	2	13
Interfase estroma/tumor>intratumorales (periferia)	0	1	0	3	4
Intratumorales	3	0	0	1	4
	48	4	11	27	90

3.5. Relación de las categorías IC con la composición de los TILs

La composición de los TILs mostró un predominio de macrófagos sobre linfocitos en la categoría IC3 (16/27 casos), y linfocitos sobre macrófagos en las categorías IC2 (6/11) e IC0 (5/11).

Composición de los infiltrados inflamatorios asociados al tumor (TILs)	IC0 <1%	IC1 [≥1% <5%]	IC2 [≥5% <10%]	IC3 ≥10%	
Ausente	37	0	0	0	37
Macrófagos=linfocitos	3	1	2	5	11
Macrófagos>linfocitos	3	2	3	16	24
Macrófagos<linfocitos	5	1	6	6	18
	48	4	11	27	90

3.6. Relación de las categorías IC con el porcentaje de linfocitos T CD8+ en los TILs

En los 11 casos de la categoría IC0 con TILs PD-L1+, el porcentaje de linfocitos T CD8+ en los TILs localizados en el estroma era ≤18,5% en el 25% de los casos, ≤28% en un 50% de los casos y ≤39% en el 75% de los casos. El porcentaje de linfocitos T CD8+ presentes en los TILs localizados en el interior de los nidos neoplásicos era ≤1% en el 25% de los casos, ≤6% en un 50% de los casos y ≤19% en el 75% de los casos.

En los 4 casos de la categoría IC1, el porcentaje de linfocitos T CD8+ en los TILs localizados en el estroma era ≤13,5% en el 25% de los casos, ≤27% en un 50% de los casos y ≤37% en el 75% de los casos. El porcentaje de linfocitos T CD8+ presentes en los TILs localizados en el interior de los nidos neoplásicos era ≤3% en el 25% de los casos, ≤21,5% en un 50% de los casos y ≤47% en el 75% de los casos.

En los 11 casos de la categoría IC2, el porcentaje de linfocitos T CD8+ en los TILs localizados en el estroma era $\leq 11\%$ en el 25% de los casos, $\leq 29\%$ en un 50% de los casos y $\leq 49\%$ en el 75% de los casos. El porcentaje de linfocitos T CD8+ presentes en los TILs localizados en el interior de los nidos neoplásicos era $\leq 2\%$ en el 25% de los casos, $\leq 9\%$ en un 50% de los casos y $\leq 13\%$ en el 75% de los casos.

En los 27 casos de la categoría IC3, el porcentaje de linfocitos T CD8+ en los TILs localizados en el estroma era $\leq 28\%$ en el 25% de los casos, $\leq 37\%$ en un 50% de los casos y $\leq 50\%$ en el 75% de los casos. El porcentaje de linfocitos T CD8+ presentes en los TILs localizados en el interior de los nidos neoplásicos era $\leq 6\%$ en el 25% de los casos, $\leq 18\%$ en un 50% de los casos y $\leq 42\%$ en el 75% de los casos.

El porcentaje de linfocitos CD8+ es mayor en el estroma que en el interior de los nidos tumorales en todas las categorías IC, excepto en la categoría IC1 donde dicho porcentaje es mayor en los nidos neoplásicos. No se ha encontrado asociación del porcentaje de linfocitos T CD8+ con el número de células PD-L1+ en los TILs.

3.7. Relación de las categorías IC con la expresión de PD-L1 en las células tumorales

Del total de 48 casos pertenecientes a la categoría IC0, en 37 (77,08%) no se observó expresión de PD-L1 en las células neoplásicas, mientras que en 11 casos sí se identificaron células tumorales PD-L1+; de éstos, en 9 (81,82%) la tinción fue intensa y en 2 casos (18,18%,) se describió como débil.

De los 4 casos de la categoría IC1, un caso fue negativo para PD-L1 en las células neoplásicas, mientras que en 3 (75%) sí se detectaron células PD-L1+ en el tumor; todos ellos con tinción intensa.

De los 11 casos de la categoría IC2, en 9 (81,82%) se observó expresión de PD-L1 en las células neoplásicas (6 intenso y 3 tinción débil), mientras que en 2 casos (18,18%) no hubo tinción en las células tumorales.

De los 27 casos de la categoría IC3, en 21 (77,78%) se identificaron células tumorales PD-L1+ con tinción intensa, mientras que en 6 casos (22,22%) la tinción en las células neoplásicas dio resultado negativo.

Tinción de PD-L1 en las células tumorales	IC0 <1%	IC1 [$\geq 1\%$ <5%]	IC2 [$\geq 5\%$ <10%]	IC3 $\geq 10\%$	
Ausente	37	1	2	6	46
Débil	2	0	3	0	5
Intensa	9	3	16	21	39
	48	4	11	27	90

Pearson chi2 = 40.1695, p= 0.000

La tinción de PD-L1 intensa en las células tumorales se asocia a un mayor porcentaje de componente inflamatorio positivo para PD-L1.

3.8. Relación de las categorías IC con la localización de las células tumorales PD-L1+ en los nidos neoplásicos

De los 11 casos de la categoría IC0 en los que se identificaron células tumorales PD-L1+, en 6 (54,55%) estas células eran más numerosas en la periferia que en el centro de los nidos tumorales en 3 (27,27%) se identificaban únicamente en la periferia de los nidos y en 2 casos (18,18%) aparecían en similar proporción en la periferia que en las zonas centrales.

De los 3 casos de la categoría IC1 en los que se observó expresión de PD-L1 en las células tumorales, en todos ellos estas células eran más numerosas en la periferia que en el centro de los nidos tumorales.

De los 9 casos de la categoría IC2 con presencia concomitante de células tumorales PD-L1+, en 5 (55,56%) éstas eran más abundantes en la periferia que en el centro de los nidos neoplásicos, en 3 (33,33%) aparecían únicamente en la periferia de los nidos y en 1 caso (11,11%) se observaban en similar cuantía en la periferia que en las zonas centrales.

De los 21 casos de la categoría IC3 en los que se identificaron células tumorales PD-L1+, en 17 (80,95%) estas células eran más numerosas en la periferia que en el centro de los nidos tumorales, en 3 (14,29%) se identificaban únicamente en la periferia de los nidos y en 1 caso (4,76%) aparecían en similar proporción en la periferia que en las zonas centrales.

La localización de las células tumorales PD-L1+ en los nidos neoplásicos mostraba un predominio en la periferia de los nidos, independientemente de la categoría IC.

VIII. Asociación de variables clínicas con la expresión inmunohistoquímica de PD-L1 en el tumor y en los TILs según los intervalos recogidos por IASLC para el clon SP142 (Ventana®)

1. En las células tumorales

a) Consumo de tabaco, edad, sexo y ECOG

Del total de 68 pacientes fumadores activos o exfumadores de la serie, la distribución por categorías de expresión de PD-L1 en las células inflamatorias asociadas al tumor fue la siguiente: TC0, 47 casos (69,12%); TC1, 4 casos (5,88%); TC2, 13 casos (19,12%); TC3, 4 casos (5,88%).

No se encontró asociación entre la edad, el sexo ni el ECOG con la expresión de PD-L1 en las células tumorales.

b) Localización del tumor

De los 7 pacientes con afectación pulmonar exclusiva, 3 casos (42.85%) se incluían en la categoría TC0,, 1 caso (14.28%) en la categoría TC1 y 3 casos (42.85%) en la categoría TC2

De los 27 pacientes con afectación pulmonar y de ganglios linfáticos mediastínicos, 18 casos (66.66%) se englobaban en la categoría TC0, 6 casos (22.22%) en la categoría TC2 y 3 casos (11.11%) en la categoría TC3.

De los 10 pacientes con afectación pulmonar y de un órgano a distancia (distinto a los ganglios linfáticos mediastínicos), 7 casos (70%) pertenecían a la categoría TC0 y 3 casos (30%) a la categoría TC2.

De los 17 pacientes con afectación pulmonar y de dos o más órganos a distancia (distintos a los ganglios linfáticos mediastínicos), 14 casos (82.35%) correspondían a la categoría TC0, 1 caso (5.88%) a la categoría TC1 y 2 casos (11.76%) a la categoría TC2.

De los 6 pacientes con afectación pulmonar, de ganglios linfáticos mediastínicos y de un órgano a distancia distinto a los ganglios linfáticos mediastínicos, 4 casos (66.66%) se englobaban en la categoría TC0 y 2 casos (33.33%) en la categoría TC1.

De los 5 pacientes con afectación pulmonar, de ganglios linfáticos mediastínicos y de dos o más órganos a distancia distintos a los ganglios linfáticos mediastínicos, 4 casos (80%) se incluían en la categoría TC0 y 1 caso (20%) en la categoría TC3.

No se encontró asociación entre las categorías TC y la localización del tumor.

c) Estadio (enfermedad localizada-EL- versus enfermedad extensa-EE-)

De los 35 pacientes con enfermedad localizada (EL), 21 casos (60%) se englobaban en la categoría TC0 ,1 caso (2,85%) en la categoría TC1, 10 casos (28,57%) en la categoría TC2 y 3 casos (11,11%) en la categoría TC3.

En el grupo de 37 pacientes con enfermedad extensa (EE), 29 casos (78,38%) correspondían a la categoría TC0, 3 casos (8,10%) a la categoría TC1, 4 casos (10,81%) a la categoría TC2 y 1 caso (2,70%) a la categoría TC3.

No se encontró asociación entre las categorías TC y el estadio EE/EL.

d) Estadio T

De los 4 casos de la serie con estadio Tx, 3 se incluían en la categoría TC0 (75%) y 1 caso en la categoría TC1 (25%).

Los 2 casos de la serie con estadio T1 correspondían a la categoría TC0.

De los 17 casos de la serie con estadio T2, 8 se englobaban en la categoría TC0 (47,06%), 1 caso en la categoría TC1 (5,88%), 6 casos en la categoría TC2 (35,29%) y 2 casos en la categoría TC3 (11,76%).

De los 7 casos de la serie con estadio T3, 6 pertenecían a la categoría TC0 (85,71%) y 1 caso a la categoría TC2 (14,29%).

De los 42 casos de la serie con estadio T4, 31 se incluían en la categoría TC0 (73,81%), 2 casos en la categoría TC1 (4,76%), 7 casos en la categoría TC2 (16,67%) y 2 casos en la categoría TC3 (4,76%).

No se encontró asociación entre las categorías TC y el estadio T.

e) Estadio N

De los 7 casos de la serie con estadio N0, 4 se incluían en la categoría TC0 (57,14%) y 3 casos en la categoría TC2 (42,86%).

De los 6 casos de la serie con estadio N1, 5 correspondían a la categoría TC0 (83,33%) y 1 caso a la categoría TC1 (16,67%).

De los 28 pacientes de la serie con estadio N2, 16 se englobaban en la categoría TC0 (57,14%), 1 caso en la categoría TC1 (3,57%), 9 casos en la categoría TC2 (32,14%) y 2 casos en la categoría TC3 (7,14%).

De los 29 casos de la serie con estadio N3, 24 se incluían en la categoría TC0 (82,76%), 2 casos en la categoría TC1 (6,89%), 1 caso en la categoría TC2 (3,46%) y 2 casos en la categoría TC3 (6,89%).

No se encontró asociación entre las categorías TC y el estadio N.

f) Estadio M

De los 29 casos de la serie sin evidencia de enfermedad metastásica (estadio M0), 17 pertenecían a la categoría TC0 (58,62%), 1 caso a la categoría TC1 (3,45%), 9 casos a la categoría TC2 (31,03%) y 2 casos a la categoría TC3 (6,89%).

De los 43 pacientes con metástasis, 33 pertenecían a la categoría TC0 (76,74%), 3 casos a la categoría TC1 (6,98%), 5 casos a la categoría TC2 (11,63%) y 2 casos a la categoría TC3 (4,65%).

No se encontró asociación entre las categorías TC y la enfermedad metastásica.

g) Recidiva

De los 21 casos de la serie sin evidencia clínico-radiológica de recidiva tumoral, 14 se englobaban en la categoría TC0 (66,67%), 1 caso en la categoría TC1 (4,76%), 5 casos en la categoría TC2 (23,81%) y 1 caso en la categoría TC3 (4,76%).

De los 48 casos de la serie en los que se produjo recidiva tumoral, 35 se incluían en la categoría TC0 (72,92%), 2 casos en la categoría TC1 (4,16%), 8 casos en la categoría TC2 (16,67%) y 3 casos en la categoría TC3 (6,25%).

No se encontró asociación entre las categorías TC y la recidiva tumoral.

h) Localización de la recidiva

De los 6 pacientes con recidiva limitada al pulmón, 1 se incluía en la categoría TC0 (16,67%), 4 casos en la categoría TC2 (66,67%) y 1 caso en la categoría TC3 (16,67%).

Los 5 pacientes con recidiva pulmonar y en ganglios linfáticos mediastínicos correspondían en su totalidad a la categoría TC0.

Del grupo de 6 pacientes con recidiva pulmonar y metástasica en un solo órgano a distancia (sin afectación ganglionar mediastínica), 3 se englobaban en la categoría TC0 (50%), 2 casos en la categoría TC2 (33,33%) y 1 caso en la categoría TC3 (16,67%).

Los 3 pacientes con recidiva pulmonar y metástasica en dos o más órganos a distancia (sin afectación ganglionar mediastínica) pertenecían a la categoría TC0.

De los 4 pacientes con recidiva en pulmón, ganglios linfáticos mediastínicos y un órgano a distancia, 3 se incluían en la categoría TC0 (75%) y 1 caso en la categoría TC2 (25%).

De los 13 pacientes con recidiva en un órgano a distancia (distinto a los ganglios linfáticos), 10 se englobaban en la categoría TC0 (76,93%), 2 casos en la categoría TC1 (15,38%), y 1 caso en la categoría TC2 (7,69%).

Los 4 pacientes en los que la recidiva se presentó como enfermedad metastásica en dos o más órganos a distancia (distintos a los ganglios linfáticos) correspondían a la categoría TC0.

No se encontró asociación entre las categorías TC y la localización de la recidiva.

i) Estado del paciente en el último seguimiento

De los 54 pacientes fallecidos por la enfermedad, 42 se incluían en la categoría TC0 (77,78%), 1 caso en la categoría TC1 (1,85%), 8 casos en la categoría TC2 (14,81%) y 3 casos en la categoría TC3 (5,56%).

De los 8 pacientes vivos en el último seguimiento pero con enfermedad activa, 4 se englobaban en la categoría TC0 (50%), 1 caso en la categoría TC1 (12,5%), 2 casos en la categoría TC2 (25%) y 1 caso en la categoría TC3 (12,5%).

De los 5 pacientes vivos sin evidencia de enfermedad activa, 2 pertenecían a la categoría TC0 (40%) y 3 casos a la categoría TC2 (60%). En este grupo no se identificaron casos correspondientes a las categorías TC1 y TC3.

No se encontró asociación entre las categorías TC y el estado del paciente en la última consulta.

2. En los infiltrados inflamatorios asociados al tumor (TILs)

a) Consumo de tabaco, edad, sexo y ECOG

Del total de 68 pacientes fumadores activos o exfumadores de la serie, la distribución por categorías de expresión de PD-L1 en las células inflamatorias asociadas al tumor fue la siguiente: IC0, 33 casos (48,52%); IC1, 3 casos (4,41%); IC2, 10 casos (14,71%); IC3, 22 casos (32,35%).

No se encontró asociación entre la edad, el sexo ni el ECOG con la expresión de PD-L1 en los TILs.

b) Localización del tumor

De los 7 pacientes con afectación pulmonar exclusiva, 2 casos (28,57%) correspondían a la categoría IC0 1 caso (14,28%) a la categoría IC2) y 4 casos (57,14%) a la categoría IC3.

De los 27 pacientes con afectación pulmonar y de ganglios linfáticos mediastínicos, 13 casos se incluían en la categoría IC0 (48,15%), 3 casos en la categoría IC2 (11,11%) y 11 casos en la categoría IC3 (40,74%).

De los 10 pacientes con afectación pulmonar y de un órgano a distancia (distinto a los ganglios linfáticos mediastínicos), 6 casos pertenecían a la categoría IC0 (60%), 1 caso a la categoría IC2 (10%) y 3 casos a la categoría IC3 (30%).

De los 17 pacientes con afectación pulmonar y de dos o más órganos a distancia (distintos a los ganglios linfáticos mediastínicos), 8 casos se englobaban en la categoría IC0 (47,06%), 2 casos en la categoría IC1 (11,76%), 4 casos en la categoría IC2 (23,53%) y 3 casos en la categoría IC3 (17,64%).

De los 6 pacientes con afectación pulmonar, de ganglios linfáticos mediastínicos y de un órgano a distancia distinto a los ganglios linfáticos mediastínicos, 2 casos se incluían en la categoría IC0 (33,33%), 2 casos en la categoría IC2 (33,33%) y 2 casos en la categoría IC3 (33,33%).

De los 5 pacientes con afectación pulmonar, de ganglios linfáticos mediastínicos y de dos o más órganos a distancia distintos a los ganglios linfáticos mediastínicos, 4 casos pertenecían a la categoría IC0 (80%) y 1 caso a la categoría IC1 (20%).

No se encontró asociación entre la localización del tumor y la expresión de PD-L1 en los TILs.

c) Estadio (enfermedad localizada-EL-versus enfermedad extensa-EE-)

De los 35 pacientes con enfermedad localizada (EL), 15 casos se englobaban en la categoría IC0 (42,86%), 4 casos en la categoría IC2 (36,36%) y 16 casos

en la categoría IC3 (69,57%). En este grupo no se identificaron casos pertenecientes a la categoría IC1.

En el grupo de 37 pacientes con enfermedad extensa (EE), 20 casos se incluían en la categoría IC0 (54,05%), 3 casos en la categoría IC1 (8,11%), 7 casos en la categoría IC2 (18,92%) y 7 casos en la categoría IC3 (18,92%).

Estadio	IC0 <1%	IC1 [≥1% <5%]	IC2 [≥5% <10%]	IC3 ≥10%	
Enfermedad localizada (EL)	15	0	4	16	35
Enfermedad extensa (EE)	20	3	7	7	37
	35	3	11	23	72

Pearson chi2 = 8.0048, p= 0.046

Se ha encontrado una asociación estadísticamente significativa entre EE/EL y las categorías IC. Los casos con mayor número de células PD-L1+ en los TILs corresponden en mayor proporción a estadios localizados (EL).

d) Estadio T

De los 4 casos de la serie con estadio Tx, 3 se englobaban en la categoría IC0 (75%) y 1 caso en la categoría IC3 (25%).

De los 2 casos de la serie con estadio T1, 1 caso (50%) se incluía en la categoría IC0 y 1 caso (50%) en la categoría IC3.

De los 17 casos de la serie con estadio T2, 4 pertenecían a la categoría IC0 (23,53%), 2 casos a la categoría IC1 (11,76%), 1 caso a la categoría IC2 (5,88%) y 10 casos a la categoría IC3 (58,82%).

De los 7 casos de la serie con estadio T3, 4 se englobaban en la categoría IC0 (57,14%), 1 caso en la categoría IC2 (14,29%) y 2 casos en la categoría IC3 (28,57%).

De los 42 casos de la serie con estadio T4, 23 se incluían en la categoría IC0 (54,76%), 1 caso en la categoría IC1 (2,38%), 9 casos en la categoría IC2 (21,43%) y 9 casos en la categoría IC3 (21,43%).

No se encontró asociación entre el estadio T y la expresión de PD-L1 en los TILs.

e) Estadio N

De los 7 casos de la serie con estadio N0, 3 se incluían en la categoría IC0 (42,86%) y 4 casos en la categoría IC3 (57,14%).

De los 6 casos de la serie con estadio N1, 3 se englobaban en la categoría IC0 (50%) y 3 casos en la categoría IC3 (50%).

De los 28 casos de la serie con estadio N2, 9 pertenecían a la categoría IC0 (32,14%), 1 caso a la categoría IC1 (3,57%), 9 casos a la categoría IC2 (32,14%) y 9 casos a la categoría IC3 (32,14%).

De los 29 casos de la serie con estadio N3, 19 se incluían en la categoría IC0 (65,51%), 2 casos en la categoría IC1 (6,89%), 2 casos en la categoría IC2 (6,89%) y 6 casos en la categoría IC3 (20,69%).

Estadio N	IC0 <1%	IC1 [≥1% <5%]	IC2 [≥5% <10%]	IC3 ≥10%	
N0	3	0	0	4	7
N1	3	0	0	3	6
N2	9	1	9	9	28
N3	19	2	2	6	29
	34	3	11	22	70

Pearson chi2= 15.8584, p= 0.070

Aunque no hay una asociación estadísticamente significativa, los casos de la categoría IC0 presentan mayor tendencia (p=0.007) a tener afectación ganglionar metastásica.

f) Estadio M

De los 29 casos de la serie sin evidencia de enfermedad metastásica (estadio M0), 13 se incluían en la categoría IC0 (44,83%), 2 casos en la categoría IC2 (6,89%) y 14 casos en la categoría IC3 (48,28%).

De los 43 pacientes con metástasis, 22 se englobaban en la categoría IC0 (51,16%), 3 casos en la categoría IC1 (6,98%), 9 casos en la categoría IC2 (20,93%) y 9 casos en la categoría IC3 (20,93%).

Estadio M	IC0 <1%	IC1 [≥1% <5%]	IC2 [≥5% <10%]	IC3 ≥10%	
M0	13	0	2	14	29
M1	22	3	9	9	43
	35	3	11	23	72

p= 0.038

Se ha encontrado asociación estadísticamente significativa entre la presencia de metástasis a distancia y el porcentaje de células PD-L1+ en los TILs.

g) Recidiva

De los 21 casos de la serie sin evidencia clínico-radiológica de recidiva tumoral, 12 se englobaban en la categoría IC0 (57,15%), 1 caso en la categoría IC1 (4,76%), 1 caso en la categoría IC2 (4,76%) y 7 casos en la categoría IC3 (33,33%).

De los 48 casos de la serie en los que se produjo recidiva tumoral, 22 se incluían en la categoría IC0 (45,83%), 2 casos en la categoría IC1 (4,17%), 10 casos en la categoría IC2 (20,83%) y 14 casos en la categoría IC3 (29,17%).

No se encontró asociación entre la aparición de recidiva y las categorías IC.

h) Localización de la recidiva

De los 6 pacientes con recidiva limitada al pulmón, 2 se incluían en la categoría IC2 (33,33%) y 4 casos en la categoría IC3 (66,67%).

De los 5 pacientes con recidiva pulmonar y en ganglios linfáticos mediastínicos, 4 correspondían a la categoría IC0 (80%) y 1 caso a la categoría IC3 (20%).

Del grupo de 6 pacientes con recidiva pulmonar y metastásica en un solo órgano a distancia (sin afectación ganglionar mediastínica), 2 se incluían en la categoría IC0 (33,33%), 2 casos en la categoría IC2 (33,33%) y 2 casos en la categoría IC3 (33,33%).

De los 3 pacientes con recidiva pulmonar y metastásica en dos o más órganos a distancia (sin afectación ganglionar mediastínica), 2 se englobaban en la categoría IC0 (66,67%) y 1 caso en la categoría IC1 (33,33%).

De los 4 pacientes con recidiva en pulmón, ganglios linfáticos mediastínicos y un órgano a distancia, 2 correspondían a la categoría IC0 (50%), 1 caso a la categoría IC2 (25%) y 1 caso a la categoría IC3 (25%).

El único paciente en el que se observó recidiva en pulmón, ganglios linfáticos mediastínicos y dos o más órganos a distancia se clasificó en la categoría IC0.

De los 13 pacientes con recidiva en un órgano a distancia (distinto a los ganglios linfáticos), 6 pertenecían a la categoría IC0 (46,15%), 3 casos a la categoría IC2 (23,08%) y 4 casos a la categoría IC3 (30,77%).

De los 4 pacientes en los que la recidiva se presentó como enfermedad metastásica en dos o más órganos a distancia (distintos a los ganglios linfáticos), 3 se incluían en la categoría IC0 (75%) y 1 en la categoría IC2 (25%).

No se encontró asociación entre la localización de la recidiva y las categorías IC.

i) Estado del paciente en el último seguimiento

De los 54 pacientes fallecidos por la enfermedad, 29 se englobaban en la categoría IC0 (53,70%), 2 casos en la categoría IC1 (3,70%), 9 casos en la categoría IC2 (16,67%) y 14 casos en la categoría IC3 (25,93%).

De los 8 pacientes vivos en el último seguimiento pero con enfermedad activa, 2 se incluían en la categoría IC0 (25%), 1 caso en la categoría IC1 (12,5%), 2 casos en la categoría IC2 (25%) y 3 casos en la categoría IC3 (37,5%).

De los 5 pacientes vivos sin evidencia de enfermedad activa, 3 pertenecían a la categoría IC0 (60%) y 2 casos a la categoría IC3 (40%).

No se encontró asociación entre estado del paciente en el último seguimiento y las categorías IC.

DISCUSIÓN

La inmunoterapia, y dentro de ella el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos frente a determinadas moléculas que actúan como puntos de control del sistema inmune, está demostrando ser una opción prometedora para el tratamiento de tumores sólidos, entre ellos el cáncer de pulmón. En este sentido se están llevando a cabo varios ensayos clínicos a gran escala destinados tanto a evaluar la eficacia de dichos tratamientos, como a tratar de diseñar test inmunohistoquímicos mediante los cuales cuantificar la expresión de dichas moléculas e implementar criterios de evaluación uniformes que permitan una adecuada selección de los pacientes susceptibles de verse beneficiados con estas terapias. Una de las terapias hasta el momento más prometedora parece ser la que utiliza anticuerpos dirigidos tanto frente a PD-1 como a sus ligandos de la familia B7; de entre ellos, PD-L1 es el biomarcador de inmunoterapia más estudiado en los ensayos clínicos de cáncer de pulmón (Yang 2014, Massarelli 2014).

Hasta la fecha se han desarrollado numerosos anticuerpos monoclonales primarios dirigidos bien frente a PD-1 bien frente a su ligando PD-L1, algunos de los cuales van asociados al empleo de determinados fármacos: nivolumab y pembrolizumab para PD-1 y atezolizumab, durvalumab y avelumab para PD-L1. Los fármacos atezolizumab y durvalumab se unen a PD-1 sin activarlo, bloqueando con su unión la interacción con el ligando PD-L1, y en consecuencia demostrando su efecto beneficioso en diferentes tipos de tumores (Herbst RS 2014, Stewart 2015, Rebelatto 2015, Borczuk 2015). En el carcinoma de pulmón los estudios se han realizado fundamentalmente en las variantes histológicas no célula pequeña; aunque ya están en desarrollo ensayos clínicos en pacientes con histología de célula pequeña, su utilidad está aún por determinar (Sun 2006, Yu 2017). En consecuencia y debido a las escasas publicaciones centradas en el CPCP (Schultheis 2015, Ishii 2015, Yu 2017, Antonia 2016), la evaluación de la expresión inmunohistoquímica de PD-L1 ha estado basada en la gran cantidad de datos disponibles respecto al CPNCP, los cuales han sido recientemente resumidos en el atlas de test inmunohistoquímico para PD-L1 de la IASCL (2017).

I. Estudios cuantitativos

1. Cuantificación de linfocitos T CD8+

La importancia de la actividad de los linfocitos T en los TILS es un hecho conocido (Aerts 2013) y el fundamento de la inclusión en este estudio de la valoración cuantitativa de la subpoblación CD8+ mediante métodos automatizados. En las muestras de la serie, tal y como era previsible en virtud del procedimiento más frecuentemente utilizado para las tomas biópsicas, se incluía representación de pared o mucosa bronquial, en los que existían infiltrados linfoides. Estos están presentes en el corion del tejido no neoplásico en condiciones normales, y forman parte del denominado “tejido linfoide asociado a mucosas”, constituido mayoritariamente por linfocitos B CD20+, que son negativos para marcadores de células T (CD3, CD4 y CD8) y por tanto fácilmente distinguibles de éstos con tinción inmunohistoquímica para CD8.

En este estudio observamos una inversión en la composición de los infiltrados linfoides de la mucosa bronquial: en los casos en los que las células neoplásicas invadían el bronquio, los linfocitos CD8+ acompañaban al tumor y se convertían en el subtipo celular mayoritario en el corion bronquial. Este hallazgo corrobora lo que hemos observado en otros tipos histológicos de carcinoma de pulmón (Conde 2017, enviado a publicación).

2. Valoración de la expresión inmunohistoquímica de PD-L1

2.1. En las células tumorales

En nuestra serie, el porcentaje de casos en los que se observó tinción inmunohistoquímica para PD-L1 en las células tumorales fue del 48,89%, mostrando una amplia variabilidad entre el valor máximo del 80% y mínimo inferior al 1%, pero en líneas generales siendo un porcentaje mayoritariamente bajo, con valores inferiores o iguales al 10% de positividad en el 75% de los casos. Respecto de las publicaciones científicas centradas en el estudio de la expresión de PD-L1 en el CPCP, el grupo de Shultheis et al (2015) no encontró positividad alguna para este biomarcador en células tumorales utilizando dos clones de PD-L1 (5H1 y E1L3N) y en el reciente estudio del grupo de Yu et al (2017) empleando los clones SP142 y 28-8 de PD-L1, la prevalencia global de expresión inmunohistoquímica para este biomarcador ha sido bastante baja (16.5%) sin encontrar marcadas diferencias entre muestras de pacientes con EL y EE. En contrapartida, el grupo de Ishii et al (2015) publicó un porcentaje de positividad de un 71,6% del total de 102 pacientes de la serie al considerar tinción positiva para PD-L1 la presente en la membrana y/o citoplasma de las células tumorales. Las grandes diferencias encontradas en estos porcentajes, entre las pocas evidencias científicas disponibles hasta el momento, pudieran estar en relación, entre otros factores, con: 1) el tipo de clon PD-L1 utilizado en el estudio inmunohistoquímico; 2) el amplio rango en el valor porcentual mínimo estipulado para considerar una muestra como positiva, que según los autores varía entre el 1% y el 50% (Brahmer 2010, Taube 2012, Ishii 2015, Schultheis 2015, Antonia 2016); 3) las diferencias en el método de examen de las muestras (evaluación de secciones histológicas completas frente a varios campos de gran aumento seleccionados de forma aleatoria e incluso en algunos trabajos, la utilización de matrices de tejido). Este último factor es especialmente importante en el CPCP, ya que, a diferencia de otros subtipos histológicos, raras veces se tratan con cirugía, y el tejido tumoral del que se dispone para estudios complementarios es, en la gran mayoría de los pacientes, muy escaso. Además, este tejido no siempre corresponde al tumor primario, sino que puede proceder de biopsias de metástasis ganglionares u otros órganos a distancia; así, a la necesidad de tener en cuenta en el análisis las diferencias inherentes a la propia heterogeneidad tumoral, hay que añadir los posibles cambios de las células tumorales al adquirir potencial metastásico.

Siguiendo las recomendaciones del atlas de test inmunohistoquímico para PD-L1 del IASLC (Tsao 2017), en nuestro estudio, la intensidad de tinción para

PD-L1 no ha sido considerada para la clasificación de las muestras como positivas o negativas, pero es importante destacar que la tinción predominante fue la intensa, que alcanzó el 88.64% de las muestras. Algunos autores han establecido un rango más amplio de categorías para definir esta intensidad (Schultheis 2015, Ilie 2016) excluyendo además aquellos casos que siendo positivos no alcanzan un determinado nivel de intensidad.

El patrón de tinción intracelular predominante fue el citoplasmático, que en nuestra serie alcanzó un 54,55% frente al 45,45% de los casos que mostraron un patrón de tinción similar en citoplasma y membrana. Este patrón fue también el mayoritario en el grupo de expresión de PD-L1 en “células tumorales aisladas”, siendo además en esta categoría el porcentaje superior, ya que alcanzó un 70,59% frente al 29,41% del segundo patrón. En referencia al CPNCP y en base al recientemente publicado atlas de test inmunohistoquímico para PD-L1 del IASCL (Tsao 2017), las especificaciones para la valoración de los diferentes test inmunohistoquímicos disponibles definen la positividad para este biomarcador como la presencia de tinción membranosa, independientemente de su intensidad y de que aparezca solo en parte de la membrana o en toda su circunferencia. Respecto al patrón de tinción en el CPCP, mientras que la mayoría de los autores considera positiva principalmente la tinción membranosa (Ishii 2015, Yu 2017), la presencia de positividad en citoplasma, aún siendo débil, se valora como positiva (Teixidó 2015, Ishii 2015, Yu 2017). A esta variabilidad anteriormente detallada, hay que sumar la dificultad añadida relativa a las propias características de las células neoplásicas del CPCP. Este conjunto de factores podrían explicar las diferencias en los patrones de tinción descritos así como la gran variabilidad porcentual observada en la expresión de PD-L1. En concreto en el CPCP la valoración del patrón de tinción de PD-L1 se ve dificultada por: 1) el reducido tamaño de las células neoplásicas, dotadas de escaso citoplasma, que dificulta la diferenciación entre la localización membranosa y la citoplasmática de la tinción; y 2) el artefacto de arrastre cromatínico de las células tumorales: este hallazgo, que por su frecuente aparición en el CPCP ha llevado a considerarlo como un criterio morfológico de apoyo al diagnóstico, conlleva una considerable dificultad al hacer el recuento del número total de núcleos de células tumorales en las áreas a valorar, ya sea mediante un procedimiento automático o mediante microscopía óptica. Este artefacto se observa también en ocasiones en las células linfoides (también de pequeño tamaño y dotadas de escaso citoplasma), por lo que a la dificultad previa hay que añadir las encontradas al intentar diferenciar las células neoplásicas de los linfocitos. Esta situación está llevando a algunos autores a recomendar la evaluación conjunta o consecutiva de CD8 y de PD-L1 (Conde 2017, enviado a publicación).

En relación a la ubicación de las células tumorales PD-L1+ en el interior de los nidos neoplásicos, el patrón predominante observado fue aquél en el que las células tumorales PD-L1+ se situaban en la zona periférica de los nidos (70,45%). Este predominio se observó también en el grupo con células

tumorales PD-L1+ aisladas. Este resultado está en la línea actual de conocimientos sobre el funcionamiento biológico del eje PD-L1/PD-1 relativos a la necesidad de interacción de este ligando y su receptor en los infiltrados inflamatorios asociados al tumor (Aerts 2013). Esta localización tan periférica podría también contribuir a explicar las enormes diferencias de positividad en las distintas series, al ser muy difícil distinguir la positividad del componente tumoral de la del componente inflamatorio (Schultheis 2015, Ishii 2015).

2.2. En los TILs

La mayoría de los trabajos publicados se centran únicamente en el estudio de la expresión de PD-L1 en las células tumorales, mientras que, algunos autores también evalúan la tinción inmunohistoquímica de este biomarcador en los TILs (Schultheis 2015, Yu 2017). En la serie que aquí se presenta, el porcentaje de expresión de PD-L1 en los TILs alcanzó el 58,89% de positividad, siendo este valor muy similar al descrito por el grupo de Schultheis et al (2015) que describió un 48% de casos positivos en su serie. Similares porcentajes han sido publicados por el grupo de Yu et al (2017), demostrando expresión de PD-L1 en el infiltrado inmune intratumoral en rangos del 56,3% (clon SP142) y del 44,8% (clon 28-8). En líneas generales, el porcentaje de células PD-L1+ sobre el total de células inflamatorias en el área evaluada fue superior al observado para las células tumorales, encontrando valores inferiores o iguales al 10% de positividad en el 75% de los casos con rango máximo del 100% y mínimos inferiores al 1%. En conjunto, todos estos datos, parecen indicar que, en el CPCP, el porcentaje de expresión de PD-L1 es superior en los TILs en comparación con la expresión para este biomarcador en las células tumorales. Es importante destacar que, en nuestro estudio, el porcentaje de expresión de PD-L1 en los TILs se sitúa en los valores máximos utilizados por los distintos autores a la hora de considerar positiva la tinción de PD-L1, tanto en la variante de CPCP como en otros subtipos histológicos (Schultheis 2015, Tsao 2017). Las consideraciones relativas a la influencia de las características propias del carcinoma de células pequeñas en la valoración de la expresión de PD-L1 son también aplicables a los TILs, tal y como ya se ha comentado previamente. En cuanto a la influencia de los factores relativos a las limitaciones derivadas del tipo y del tamaño de la muestra, algunos autores han comparado los hallazgos obtenidos en biopsias frente a piezas quirúrgicas en el CPNCP, observándose que del total de casos en los que se detectó expresión de PD-L1+ para los TILs en la pieza quirúrgica pero no en la biopsia, hasta en un 75% de los casos, esta positividad estaba presente únicamente en el componente de células inflamatorias asociado al tumor, mientras que en el 25% restante la positividad se observó tanto en las células tumorales como en las células inmunes asociadas al tumor (Ilie 2016). Este resultado permite sugerir que probablemente se infraestima la positividad de PD-L1 en las muestras biópsicas, especialmente en relación con los TILs.

En los TILs PD-L1+ se observó, al igual que en las células tumorales, predominio de la tinción intensa sobre la débil; este predominio fue además superior al observado en el componente epitelial de la neoplasia, con un

94,34% de casos con tinción intensa frente al 5,66% con tinción débil, y se mantuvo en los casos con células inflamatorias PD-L1+ aisladas, en las que se observó tinción intensa en un 81,82% frente al 18,18% de casos con tinción débil. Esta menor relevancia de la intensidad de tinción corrobora que, tanto para las células tumorales como para las células inflamatorias, lo más importante es el porcentaje de las mismas que aparecen teñidas, lo que ha relegado el uso de los llamados “H-scores” para su cuantificación (atlas IASLC 2017).

La valoración del patrón de tinción intracelular en las células inflamatorias asociadas al tumor hizo necesario tener en consideración las características morfológicas de los tipos celulares representados en los infiltrados inflamatorios asociados al tumor, esto es, los macrófagos y los linfocitos. Así, en los estudios realizados por otros autores (Tsao 2017), en las células con citoplasmas amplios y límites celulares fácilmente discernibles como los macrófagos y las células dendríticas, la tinción se define como membranosa. En el caso de las células linfoides, y debido a su escaso citoplasma, la localización de la tinción es mucho más difícil de precisar, aunque algunos la describen como citoplasmática y “en gota” (Herbst 2014, Ilie 2016). Teniendo en cuenta este hecho, para valorar la tinción intracelular de PD-L1 en los TILs, se añadió a los dos patrones de tinción intracelular un tercer patrón caracterizado por el predominio de la tinción membranosa sobre la citoplasmática, denominado “membrana>citoplasma”. Este patrón fue el observado con mayor frecuencia, encontrándose en un 50,94% de los casos frente al 24,53% de cada uno de los dos patrones restantes. En el grupo de casos TILs con células PD-L1+ aisladas, el patrón de tinción intracelular mayoritario fue el de similar intensidad en la membrana que en el citoplasma, alcanzando el 45,45% del total de casos positivos frente al 27,27% observado para cada uno de los dos patrones de tinción intracelular restantes. Este resultado permite sugerir que existe asociación entre la expresión porcentual de PD-L1 en los TILs y el patrón de tinción intracelular para dicho marcador, en probable relación con la variación de su localización intracelular en función del número de células inflamatorias PD-L1+; el análisis posterior permitió confirmar estadísticamente esta observación.

En cuanto a la localización de las células inflamatorias PD-L1+ en los diferentes componentes del tumor, observamos un discreto predominio de la presencia simultánea de células PD-L1+ en el estroma y en los nidos neoplásicos frente a la localización exclusiva en el estroma o en el interior de los agregados neoplásicos (50,94% frente al 41,51% y al 7,55%, respectivamente). De los 5 patrones de localización definidos en el estudio, el predominante fue el patrón “interfase estroma/tumor>estroma peritumoral>intratumorales”, suponiendo un 43,39% del total de casos con TILs PD-L1+. Tanto en los casos con células positivas situadas en el estroma y en los nidos neoplásicos como en los casos con células inmunorreactivas presentes únicamente en el estroma, éstas eran más numerosas en el área estromal inmediatamente adyacente a los nidos neoplásicos que el localizado a

cierta distancia de los agregados neoplásicos, entre unos nidos tumorales y otros. Este resultado está en consonancia con las más recientes especificaciones relativas a la valoración de PD-L1 en los TILs, en las que se recomienda la inclusión exclusiva en el análisis del estroma inmediatamente adyacente a los nidos neoplásicos (Tsao 2017). En cuanto a su presencia en el interior de los nidos neoplásicos, ya fuera de forma exclusiva o asociada a la localización estromal, las células inflamatorias PD-L1+ aparecían con más frecuencia distribuidas de forma similar en el área central y en la periferia sin mostrar preferencia por ésta última, a diferencia de lo observado en las células tumorales PD-L1+. También se encontraron diferencias en la localización de las células inflamatorias PD-L1+ aisladas que se situaban mayoritariamente de forma exclusiva en el estroma (54,55%) frente a la localización exclusiva en el interior de los nidos neoplásicos (27,27%) y a la colocalización tanto en estroma como en los agregados epiteliales del tumor (18,18%).

Con respecto al patrón de composición de los TILs PD-L1+, el mayoritario fue aquel en el que predominaban los macrófagos sobre los linfocitos (45,28%), seguido del patrón inverso (“macrófagos<linfocitos”, 33,96%) y por último del patrón con similar representación de ambos tipos celulares (20,76%). La presencia de infiltrados inflamatorios asociados al tumor PD-L1+ a expensas de células de estirpe macrofágica ha sido también descrita por otros autores. El grupo de Shultheis et al (2015) describió un porcentaje inferior al de nuestra serie (18,5%) mientras que el grupo de Yu et al (2017), detalló porcentajes de expresión PD-L1 elevados, tanto en enfermedad limitada (clon SP142 [56,3%] y clon 28-8 [44,8%] en células con citoplasma claramente identificable sugestivas de ser macrófagos y células dendríticas) como en enfermedad extendida. El elevado porcentaje de casos en nuestra serie con macrófagos PD-L1+ puede deberse a la inclusión en el análisis de las muestras en las que observamos expresión de dicho marcador en los macrófagos intraalveolares situados en el tejido pulmonar adyacente a la neoplasia, a los que se definió como “macrófagos intraalveolares yuxtatumorales”. La tinción de PD-L1 observada era mayoritariamente intensa y de patrón citoplasmático predominante. Consideramos que la tinción de estos macrófagos no puede considerarse inespecífica, ya que: 1) la positividad para PD-L1 era equiparable desde el punto de vista inmunohistoquímico al de otros tipos celulares evaluados; 2) no aparece de forma indiscriminada en todos los casos; y 3) la tinción es especialmente significativa en intensidad y representación porcentual en los casos con diseminación tumoral intraalveolar marcada, en los que la mayoría de los macrófagos descamados son PD-L1+ positivos. En estos últimos casos los macrófagos PD-L1+ aparecían no solo a cierta distancia del tumor, sino también en la zona periférica y en el interior de los nidos tumorales intraalveolares. A fin de evitar la excesiva subcategorización, y dado que se observaban con más frecuencia en el tejido situado a cierta distancia del tumor, los macrófagos intraalveolares PD-L1+ se consideraron en el análisis posterior como TILs PD-L1+ localizados en el estroma peritumoral. También se observó en algunos casos expresión inequívoca de PD-L1 en las células endoteliales de los capilares alveolares; aunque esta tinción ya ha sido

descrita por otros autores (Sharpe 2007, Parsa 2007, Brahmer 2012), su relevancia biológica está aún por determinar.

En cuanto a la composición de los infiltrados inflamatorios con células PD-L1+ aisladas, éstos se componían en mayor medida de linfocitos que de células de estirpe macrófaga, es decir, el patrón predominante fue el denominado “macrófagos<linfocitos”. Este patrón suponía un 45,45% del total de casos con células PD-L1+ aisladas en los TILs, frente al 27,27% observado para cada uno de los dos patrones de composición celular restantes (“macrófagos>linfocitos” y “macrófagos=linfocitos”). Si bien la significación biológica de las diferencias de composición de los infiltrados requieren probablemente un mayor número de estudios, en las últimas publicaciones se propone que la valoración de PD-L1 en los TILs se realice únicamente en función de la presencia o ausencia de tinción, sin tener en cuenta el tipo de célula inflamatoria que exprese dicho marcador (Tsao 2017).

Según lo expuesto previamente, en lo que respecta a TILs y a diferencia de lo observado en las células tumorales, el patrón de tinción de PD-L1 intracelular, su localización en los distintos componentes de la neoplasia y la composición de los TILs se modifican dependiendo del porcentaje de células PD-L1+ sobre el total de células inflamatorias evaluadas. Esto permitiría sugerir que la variación en el porcentaje de células PD-L1 positivas en los TILs es un factor capaz de modificar y/o verse modificado por las características y la dinámica del microambiente inmune y del propio antígeno PD-L1.

II. Asociación de la expresión de PD-L1 en las células tumorales y en los TILs

En nuestra serie hemos observado una tendencia a la concordancia en la presencia o ausencia de expresión de dicho marcador entre las células tumorales y los TILs ($p<0.001$). Así, en la mayoría de los casos con células tumorales negativas para PD-L1 tampoco se detectó tinción para este biomarcador en los TILs (76,09% de los casos frente al 23,91% de los casos con células tumorales PD-L1- que resultaron PD-L1+ en los TILs). Del total de casos con células tumorales PD-L1+, en un 95,45% también se observó expresión de dicho marcador en las células inflamatorias, y únicamente en el 4,55% de los casos con células tumorales PD-L1+ no se observó expresión asociada en las células inflamatorias. El porcentaje de casos con células tumorales PD-L1- y TILs PD-L1+ fue del 23,91%. Esta tendencia a la asociación se mantenía en los casos de baja expresión porcentual de PD-L1 en las células neoplásicas, esto es, en la categoría de “células tumorales PD-L1+ aisladas”. En los casos de la serie con células inflamatorias PD-L1+ aisladas también se mantenía la tendencia a la coexpresión de dicho marcador en las células tumorales observada en casos con TILs PD-L1+ en cifras porcentuales superiores. Así, en este grupo se identificaron células tumorales PD-L1+ en el 81,82% de los casos frente al 18,18% con resultado negativo en las células neoplásicas. La proporción de células tumorales PD-L1+ sobre el total de células neoplásicas del área evaluada se situaba no obstante, al igual que

sucedía con el grupo de células tumorales PD-L1+ aisladas, en cifras porcentuales bajas. Además, en este grupo el patrón de tinción intracelular mayoritario en las células tumorales fue el denominado “membrana=citoplasma”, presente en un 55,56% frente al 44,44% en el que predominó la tinción citoplasmática sobre la membranosa (patrón “citoplasma>membrana”). Por tanto, existe asociación no solo entre el resultado de la tinción inmunohistoquímica entre las células tumorales y los TILs, sino también con su representación porcentual sobre el total de células evaluadas y, en los casos con células tumorales PD-L1+, con el patrón de tinción intracelular de éstas. En el grupo de casos con coexpresión de PD-L1 en las células inflamatorias y en las células tumorales no parece sin embargo que exista asociación con la intensidad de tinción ni con la localización intratumoral de las células neoplásicas: en este grupo se observó, al igual que en el total de casos de la serie, predominio de la tinción intensa (77,78% frente al 22,22% de los casos con tinción débil) y de la localización de las células tumorales PD-L1+ en la periferia de los nidos neoplásicos, con arreglo al patrón denominado “periferia>centro de los nidos tumorales” (44,45% de los casos, frente al 33,33% con células tumorales PD-L1+ presentes solo en la periferia de los nidos y al 22,22% de los casos en los que se observaban en número similar en la periferia y en el centro de los agregados neoplásicos).

En cuanto a la asociación entre el patrón de localización de los TILs PD-L1+ y la expresión de dicho marcador en las células tumorales, el patrón “interfase estroma/tumor> estroma peritumoral> intratumorales” fue el predominante tanto en los casos con células tumorales PD-L1+ como en los casos negativos; además, en estos últimos no se identificaron TILs+ de localización exclusiva en el interior de los nidos neoplásicos, presentes únicamente en caso de coexpresión de dicho marcador en las células tumorales. Este resultado apoyaría la hipótesis de que la localización de los TILs PD-L1+ en los distintos componentes del tumor se vería modificada no solo por la variación en la expresión porcentual de PD-L1 en los TILs mencionada previamente, sino también por la presencia o ausencia de expresión de PD-L1 en las células tumorales. Otros autores también han encontrado diferencias en la localización de las células inflamatorias PD-L1+ en función de la expresión de dicho marcador en las células tumorales, si bien con patrones diferentes. Ilie et al (2016) describen que las células inmunes PD-L1+ presentes en tumores con células neoplásicas PD-L1+ se localizan mayoritariamente en los tractos de estroma entre los nidos neoplásicos o en el interior de los nidos epiteliales neoplásicos, mientras que las que aparecen en los tumores PD-L1- se localizan mayoritariamente en forma de agregados tanto en el interior de los nidos tumorales como en la interfase estroma-tumor y el estroma localizado en la periferia de los nidos neoplásicos.

III. Asociación de variables clínicas con la expresión inmunohistoquímica de PD-L1

1. En las células tumorales

En este estudio no hemos observado asociación estadísticamente significativa entre los resultados de la expresión de PD-L1 en las células tumorales (intensidad, patrón de tinción intracelular y localización en los nidos neoplásicos) con ninguna de las variables clínicas evaluadas. La ausencia de expresión de PD-L1 en células tumorales, aunque sin alcanzar significación estadística, ha mostrado una tendencia a la asociación con la aparición de recidiva tumoral. Así, en los pacientes con recidiva se observó un ligero predominio de muestras con ausencia de expresión de PD-L1 en las células tumorales sobre los casos PD-L1+ (58,33% frente a 41,67%), mientras que en los pacientes sin evidencia de recidiva, el porcentaje de casos PD-L1+ era superior al de los casos con resultado negativo en el test (61,9% frente a 38,1%). Aunque estos resultados no son estadísticamente significativos, están alineados con los hallazgos de algunos autores que encuentran mayor supervivencia global en los pacientes PD-L1 positivos, incluso en el análisis multivariante (Ishii 2015).

En cuanto a la evaluación de la asociación entre la expresión inmunohistoquímica de PD-L1, la supervivencia global y el intervalo libre de enfermedad hay que tener presente que se ve dificultada por el mal pronóstico de los pacientes inherente al comportamiento biológico de este tipo de neoplasia y a su pobre respuesta a los tratamientos actualmente en uso (Travis 2012), lo que conlleva una disminución rápida del número de pacientes y la consiguiente pérdida de potencia estadística.

2. En los TILs

En este estudio no hemos observado asociación estadísticamente significativa entre los resultados de la expresión de PD-L1 en los TILs con ninguna de las variables clínicas evaluadas. Tampoco se observó significación estadística ni tendencia a la asociación entre la expresión de PD-L1 en TILs y la aparición de recidiva.

IV. Estudio de grupos de expresión inmunohistoquímica combinada de PD-L1 en las células tumorales y en los TILs

La clasificación de los tumores en base al estatus combinado de expresión de PD-L1 tanto en células tumorales como en TILs ha sido propuesta por algunos autores por su utilidad para seleccionar pacientes con mayor probabilidad de responder a la inmunoterapia (Teng 2015). En nuestra serie, los grupos combinados más numerosos fueron T+/I+ y T-/I-, en los que se incluían el 46,67% y el 38,89% de los casos respectivamente. Los dos grupos restantes comprendían el 12,22% (T-/I+) y el 2,22% (T+/I-). La agrupación de los tumores según expresión combinada tampoco se asoció de forma estadísticamente significativa con ninguna de las variables analizadas. En

relación al estadio N, se ha encontrado una asociación estadísticamente significativa de esta variable con los grupos obtenidos por combinación T/I. En los casos con metástasis ganglionares en estadio N2, se observó un predominio de los casos pertenecientes al grupo T+/I+ (64,29%). Aunque este resultado pudiera llevar a sugerir una asociación de la coexpresión de PD-L1 con estadios avanzados, hay que tener en cuenta que: 1) el grupo T+/I+ también fue el predominante en los casos sin metástasis ganglionares (42,86% del total de casos N0); 2) en los casos con metástasis ganglionares estadio N3 el grupo predominante fue el T-/I-, con un 55,17% frente al 37,93% del grupo T+/I+ y 3) en los casos N1 no fue el grupo T+/I+ el predominante, sino el T-/I+, con un 50% de los casos frente al 16,67% del primero de ellos. La distribución por grupos parece pues seguir la proporción numérica global que presentan en la serie; aunque el grupo T+/I- no aparece en los casos con metástasis ganglionares, sino únicamente en el estadio N0, al ser el menos representado de ello no puede deducirse asociación con un mejor pronóstico. Tampoco puede establecerse asociación entre la concordancia del resultado de la tinción entre las células tumorales y las inflamatorias y el estadio N, puesto que los grupos con tinción análoga de ambos componentes son los más numerosos tanto entre los casos sin metástasis como entre los estadios ganglionares avanzados.

En cuanto al estado del paciente en el último seguimiento, el análisis dio un resultado similar al descrito para el estadio N, con una asociación estadísticamente significativa de esta variable con los grupos obtenidos por combinación T/I. Así, y aunque entre los fallecidos por la enfermedad el grupo más numeroso fue el T+/I+ con un 42,59%, el grupo T-/I- se encontraba representado en una proporción similar (40,74%); ambos eran además los predominantes entre los casos vivos sin evidencia de enfermedad (40% para cada uno de los grupos). En el grupo de pacientes vivos con enfermedad únicamente se observaron casos pertenecientes a los grupos T+/I+ y T-/I-, con representación mayoritaria del primero (75%, frente al 25% del segundo). El único paciente vivo sin enfermedad pertenecía al grupo T+/I- (el menos numeroso de la serie) pero su escasa representación impide que de este hecho se infiera ninguna conclusión.

V. Análisis de la tinción inmunohistoquímica de PD-L1 en las células tumorales y en los TILs según los intervalos recogidos por IASLC para el clon SP142 (Ventana®)

En la última parte de este estudio los casos se agruparon en función de la expresión porcentual de PD-L1 en las células tumorales y en los infiltrados inflamatorios asociados al tumor según los intervalos especificados para el test inmunohistoquímico con el clon SP142 recogidas por la IASLC para el CPNCP.

La redistribución de la serie con arreglo a estos valores porcentuales supone una disminución del porcentaje total de casos con células tumorales PD-L1+. Esto puede atribuirse a la reclasificación de los casos con expresión inferior al 1% (el grupo con “células tumorales PD-L1+ aisladas”), considerados

previamente como positivos, en la categoría TC0, que correspondería a los casos interpretados como negativos. Hay que tener presente que los intervalos recogidos en la IASLC se han establecido tras la evaluación de PD-L1 en el CPNCP, en concreto el AC y el CE. El hecho de que, tal y como se ha descrito en este estudio, la expresión de PD-L1 en el CPCP se muestra con frecuencia en un porcentaje reducido de células sobre el total de células tumorales evaluadas (con un 75% de los casos situados en valores $\leq 10\%$), podría hacer necesaria la definición de scores de tinción específicos para este subtipo histológico.

El análisis de la expresión inmunohistoquímica de PD-L1 tras la agrupación de los casos en las categorías mencionadas muestra observaciones muy parecidas a las ya expuestas previamente con algunas de las variables estudiadas como la intensidad y el patrón de tinción, así como con la localización de las células tumorales PD-L1+ en los nidos neoplásicos.

En relación al tipo de tinción, la intensa fue la más observada en todos los grupos, y los casos con tinción débil (5,56% del total de casos de la serie) pertenecían a las categorías TC0 y TC1, es decir, a aquéllas con menor expresión porcentual de PD-L1 en las células tumorales, siendo además más numerosos en la primera de ellas que en la segunda (85,56% frente al 14,44% del total de casos con tinción débil). Se mantiene pues la observación de que existe una asociación entre la intensidad de tinción y la proporción de células PD-L1+ en los nidos tumorales.

En cuanto al patrón de tinción intracelular, el patrón “citoplasma>membrana” fue también el observado con más frecuencia en las categorías TC0 y TC1. En la categoría TC2 predominaba sin embargo el patrón de similar intensidad (“citoplasma=membrana”), y en la TC3 se mostraron en igual número el patrón “membrana=citoplasma” y “citoplasma>membrana”. La agrupación por categorías demuestra pues la existencia de asociación entre el patrón de tinción intracelular de PD-L1 y la proporción de células tumorales PD-L1+ sobre el total del área examinada. Este resultado podría ser indicativo de cambios en la localización intracelular de PD-L1 en función del número de células con expresión de dicho marcador, y estar por tanto relacionada con su mayor o menor actividad.

La agrupación por categorías pone así mismo de manifiesto la asociación de la expresión porcentual con la localización de las células PD-L1+ en los nidos neoplásicos. El patrón de localización predominante en la serie, “periferia>centro de los nidos neoplásicos”, fue también el mayoritario en las categorías TC0, TC1 y TC2. Sin embargo, en el grupo TC3 las células tumorales PD-L1+ se localizaban en similar cuantía en la periferia y en el centro de los nidos.

La agrupación por categorías apoya así mismo la existencia de asociación entre: 1) la tendencia a la concordancia en el resultado de la tinción para PD-L1 en las células tumorales y en los TILs; 2) la intensidad de tinción en los

TILs y el porcentaje de expresión de PD-L1 en las células tumorales; 3) la composición de los infiltrados inflamatorios asociados al tumor y la proporción de células tumorales PD-L1+; y 4) la localización de los TILs PD-L1+ en los distintos componentes del tumor y la expresión de PD-L1 en las células tumorales.

Así, mientras que en las categorías TC1, TC2 y TC3 se observó una única muestra con ausencia de expresión de PD-L1 en los TILs, en la categoría TC0 el 57,14% de los casos resultaron negativos para PD-L1 en los TILs. Aunque la tinción de los TILs PD-L1+ fue descrita como intensa en todas las categorías, hay que señalar que no se identificaron casos con tinción débil en TC1, TC2 y TC3; estos casos aparecían únicamente en la categoría TC0.

En relación a la composición de los TILs, en las dos categorías con mayor número de muestras (TC0, 27 muestras y TC2, 18 muestras), predominaban los macrófagos sobre los linfocitos. Esta asociación se relaciona con la observada entre las categorías TC y el patrón de tinción intracelular de PD-L1 en los TILs, ya que en las categorías en las que los macrófagos eran más numerosos, el patrón de tinción membranosa predominaba sobre la citoplasmática.

En cuanto a la relación entre las categorías TC y la localización de las células inflamatorias PD-L1+ en los diferentes componentes del tumor, observamos que el patrón denominado “interfase estroma/tumor>estroma peritumoral>intratumorales” fue el predominante en todas las categorías, seguido en frecuencia por los dos patrones de localización estromal exclusiva. El patrón menos frecuente fue también en todas ellas el de localización exclusiva en el interior de los nidos neoplásicos; en las categorías TC1 y TC3 no se observaron casos que siguieran este patrón. En cuanto a la representación de los dos patrones de localización estromal exclusiva, observamos diferencias según la categoría: así, el denominado “estroma peritumoral> interfase estroma/tumor” fue el predominante en la categoría TC0, mientras que el patrón “interfase estroma/tumor>estroma peritumoral” predominó en las categorías TC1, TC2 y TC3. De este resultado podría inferirse que existiría un “desplazamiento” de los TILs desde el estroma situado entre los nidos neoplásicos hacia el localizado inmediatamente adyacente a las células tumorales a medida que aumenta la expresión de PD-L1 en las células neoplásicas.

En cuanto a la presencia de linfocitos T CD8+, éstos, al igual que en el total de la serie, eran más numerosos en el estroma que en el interior de los nidos neoplásicos independientemente del grupo TC.

Para los TILs, el grupo más numeroso de la serie fue el grupo IC0 (53,33 %) seguido del grupo IC3 (30%). Al igual que sucedía con las células tumorales, la redistribución de la serie con arreglo a estos valores porcentuales conlleva una disminución del porcentaje total de casos con células PD-L1+ en los TILs, por

lo que también para las células inflamatorias sería recomendable definir scores de evaluación específicas para el CPCP.

Al igual que en el análisis por categorías de las células tumorales, la tinción intensa fue la más frecuentemente observada en todas los grupos IC definidos, manteniéndose por tanto en los TILs la observación realizada en las células tumorales referida a que la tinción débil de PD-L1 aparece mayoritariamente en las categorías con menor expresión porcentual de dicho marcador. Así pues, y tal como ya se ha reflejado en esta discusión, la observación de que existe una asociación entre la intensidad de tinción y la proporción de células PD-L1+ parece poder hacerse extensiva también a las células inflamatorias.

El análisis por categorías IC apoya la conclusión de que, a diferencia de lo observado en las células tumorales, el patrón de tinción intracelular, la localización de las células inflamatorias PD-L1+ en los distintos componentes de la neoplasia y la composición de los TILs se modifican dependiendo del porcentaje de células PD-L1+ sobre el total de células inflamatorias evaluadas. En cuanto al patrón de tinción intracelular en las células inflamatorias PD-L1+, el predominio de la tinción membranosa sobre la citoplasmática fue observado con más frecuencia en las categorías IC1, IC2 e IC3; dado que en el caso de las células tumorales dicho patrón predominaba en la categoría TC0, la hipótesis previamente expuesta de la existencia de cambios en la localización intracelular de PD-L1 en función del número de células con expresión de dicho marcador (en posible relación con su mayor o menor actividad) se produciría de forma inversa en las células inflamatorias asociadas al tumor con respecto a las tumorales. En la categoría IC0 el patrón de tinción predominante fue el de similar intensidad en la membrana que en el citoplasma.

En relación a la localización de las células inflamatorias PD-L1+ en los diferentes componentes del tumor según las categorías IC, observamos que el patrón denominado “interfase estroma/tumor>estroma peritumoral>intratumorales” fue el predominante en las categorías IC2 e IC3, pero no en IC0 ni en IC1. En esta última predominó la localización estromal exclusiva, y de los dos patrones incluidos en este epígrafe, el más frecuente fue el denominado “interfase estroma/tumor>estroma peritumoral”. En la categoría IC0 se observó el mismo número de casos con localización intratumoral exclusiva que con localización únicamente estromal, y ambos además eran superiores al número de casos con células PD-L1+ presentes de forma simultánea en ambos componentes del tumor. En la categoría IC1 predominó el patrón “interfase estroma/tumor>estroma peritumoral”. Este resultado apoya la hipótesis del “desplazamiento” de las células inflamatorias en relación al aumento de expresión de PD-L1 en los TILs, que en este caso podría describirse como una “propagación” o extensión desde uno de los componentes del tumor (el estroma o las células tumorales) al otro.

En el análisis por categorías también hemos observado asociación significativa entre la composición de los infiltrados inflamatorios asociados al tumor y la

proporción de células inflamatorias PD-L1+ presentes en los TILs. Así, en la categoría IC3 predominaban los macrófagos sobre los linfocitos, mientras que en el grupo IC0 e IC2 los TILs se componían mayoritariamente de linfocitos. En cuanto a la presencia de linfocitos T CD8+, observamos una inversión de los resultados descritos en las categorías TC. Así, los porcentajes máximos de linfocitos T en el estroma tumoral se observaron en la categoría IC3, mientras que en la categoría IC1 no solo aparecían las cifras porcentuales más altas de células inflamatorias PD-L1 en los nidos neoplásicos, sino que éstas superaban a las estromales ($\leq 47\%$ frente a $\leq 37\%$ en el 75% de los casos). Hay que señalar no obstante que en la categoría IC3 también se observaron proporciones altas de linfocitos CD8+ en el interior de los nidos neoplásicos ($\leq 42\%$ en el 75% de los casos).

En cuanto a la relación entre las categorías IC con la localización de las células tumorales PD-L1+ en los nidos neoplásicos, el patrón de localización “periferia>centro de los nidos neoplásicos” fue mayoritario en las categorías IC0, IC1 e IC2, en porcentajes del 54,55%, 100% y 55,56%, respectivamente. Este predominio se observó también en las categorías TC0, TC1 y TC2, aunque en estos grupos la diferencia porcentual en TC0 y TC2 con la representación de otros patrones era mayor. Sin embargo, a diferencia del grupo TC3, en el que las células tumorales PD-L1+ se localizaban en similar cuantía en la periferia y en el centro de los nidos, en la categoría IC3 el patrón de localización predominante fue también el denominado “periferia>centro de los nidos neoplásicos”. Los casos en los que las células PD-L1+ se situaban únicamente en la periferia de los nidos y/o en similar cuantía en el centro y en la periferia aparecían en las categorías IC0, IC2 e IC3, siendo especialmente numerosas en la primera de ellas. En el grupo IC1 no se observó representación de estos patrones. Parece pues que la asociación entre la distribución de las células PD-L1+ en los nidos tumorales y su representación porcentual sobre el total de células neoplásicas descrita en el análisis de las categorías TC se modifica en los casos con mayor expresión porcentual de PD-L1 en los TILs.

El análisis de la expresión de PD-L1 en las células tumorales según categorías IC también apoya la tendencia a la concordancia en la presencia o ausencia de expresión de dicho marcador en las células neoplásicas y las células inflamatorias. Así, en el grupo IC0 predominaban los casos con células tumorales PD-L1- (77,08%), mientras que en las categorías IC1, IC2 e IC3 se observó mayoría de casos con células tumorales PD-L1+, con proporciones del 75%, 81,82% y 77,78%, respectivamente. Es necesario no obstante señalar que en todas las categorías, aunque fuera en número muy reducido, se encontraron casos con células tumorales PD-L1-. En los casos con células tumorales PD-L1+ la tinción intensa fue la más frecuentemente observada en todas las categorías. La tinción débil se observó en las categorías IC0 e IC2, siendo más numerosa en esta última, y no aparecía representada en las categorías IC1 e IC3 ($p < 0.001$).

VI. Asociación de variables clínicas con la expresión inmunohistoquímica de PD-L1 en el tumor y en los TILs según los intervalos recogidos por IASLC para el clon SP142 (Ventana®)

La agrupación de los casos según categorías TC tampoco ha conseguido demostrar asociación estadísticamente significativa de los distintos aspectos de expresión de PD-L1 en las células tumorales con las variables clínicas incluidas en el estudio. En las categorías IC se ha observado una asociación significativa con el estadio (enfermedad localizada versus enfermedad extensa), observándose que los pacientes con enfermedad localizada se incluían mayoritariamente en la categoría IC3, mientras que aquéllos con enfermedad extensa pertenecían en su mayor parte a la categoría IC0. En la misma línea hemos encontrado que los casos de la categoría IC0 tienen mayor capacidad de metastatizar que los casos IC3 (62.86% versus 39.13% respectivamente, $p=0.038$). Estos resultados dotan de importancia a la expresión de PD-L1 en el componente inflamatorio en el CPCP. En el trabajo de Ishii et al. la expresión de PD-L1 confiere buen pronóstico (asociación con mayor supervivencia global y enfermedad limitada) en el CPCP, sin embargo no especifican si la expresión es de las células tumorales o de los TILs. Hasta donde conocemos, no hay trabajos que identifiquen el papel pronóstico de la expresión de este biomarcador en las células inflamatorias del CPCP.

CONCLUSIONES

1. En una serie de 90 muestras de carcinoma de pulmón de células pequeñas (CPCP), se ha observado, en las células tumorales, tinción inmunohistoquímica positiva para PD-L1 en el 48,89% de los casos. En las células inflamatorias asociadas al tumor o TILs, este porcentaje asciende al 58,89%.

2. En las células tumorales, el patrón de tinción predominante ha sido el intenso sobre el débil, observándose en el 88,64% de los casos. Respecto al patrón de tinción intracelular, un 54,55% de los casos presenta mayor tinción en el citoplasma que en la membrana.

3. En los TILs también se ha observado predominio de la tinción intensa en el 94,34% de los casos. Al contrario que en las células tumorales, el patrón de tinción intracelular predominante ha sido el membranoso (50,94% de los casos).

4. Las células tumorales PD-L1+ se situaban mayoritariamente en la zona periférica de los nidos tumorales (70,45%). En los TILs PD-L1+ se ha observado un discreto predominio de la presencia simultánea tanto en estroma como en los nidos neoplásicos (50,94%) frente a la localización exclusiva en el estroma o en el interior de los agregados tumorales (41,51% y 7,55%, respectivamente).

5. En la composición celular de los TILs PD-L1+, el linaje celular predominante ha sido la estirpe macrofágica sobre la linfocitaria (45,28% de los casos). En los casos de TILs con células PD-L1+ en cuantía menor al 1%, la composición celular se invertía predominando los linfocitos sobre los macrófagos.

6. No hemos encontrado asociación estadísticamente significativa entre la expresión inmunohistoquímica de PD-L1, tanto en las células tumorales como en los TILs, con ninguna de las variables clínicas evaluadas. La ausencia de

expresión de PD-L1 en las células tumorales, aunque no llega a alcanzar significación estadística, muestra una tendencia a la asociación con la recidiva tumoral ($p=0,057$).

7. La agrupación de los tumores en base al estatus combinado de expresión de PD-L1 en células tumorales y en los TILs ha mostrado que, en el CPCP, los grupos más numerosos son aquéllos que muestran concordancia en el resultado de la tinción para este biomarcador en ambos componentes de la neoplasia. Esta agrupación no se asoció de manera estadísticamente significativa con ninguna de las variables clínicas evaluadas, a excepción de la afectación ganglionar ($p=0,005$) y el estado del paciente en el último seguimiento ($p=0,011$).

8. En el CPCP el análisis de la tinción inmunohistoquímica de PD-L1 en las células tumorales y en los TILs según los intervalos recogidos por la IASLC para el clon SP142 supone una disminución del porcentaje total de casos con células tumorales y/o inflamatorias PD-L1+.

9. Al agrupar las células tumorales PD-L1+ según las categorías TC se observa una asociación estadísticamente significativa entre el porcentaje de células positivas para este biomarcador y la intensidad de tinción ($p<0.001$). Esta agrupación en categorías no ha mostrado asociación estadísticamente significativa con ninguna de las variables clínicas incluidas en el estudio.

10. En relación a las categorías IC, se ha observado una asociación estadísticamente significativa de esta agrupación con el estadio en términos de enfermedad localizada versus enfermedad extensa. En nuestra serie, los pacientes con enfermedad localizada se incluían mayoritariamente en la categoría IC3, mientras que aquéllos con enfermedad extensa pertenecían en su mayor parte a la categoría IC0. En esta misma línea de resultados, hemos encontrado que los casos clasificados en la categoría IC0 tienen mayor capacidad de dar metástasis a distancia (estadio M1) que los casos clasificados

en la categoría IC3 (62,86% versus 39,13% respectivamente, $p=0,038$). Tal y como hemos comentado previamente, el grupo de Ishii et al (2015) encuentra que la expresión de PD-L1 en las células tumorales del CPCP confiere buen pronóstico en términos de supervivencia global y enfermedad limitada, incluso en el análisis multivariante. Con respecto al papel de la expresión de este biomarcador en las células inflamatorias, hasta el momento no hay trabajos publicados que clarifiquen este punto, por lo que los resultados obtenidos en esta serie necesitarían ser refrendados en estudios más amplios que permitieran demostrar la importancia de la expresión de PD-L1 en el componente inflamatorio del CPCP.

11. En el CPCP, el número de linfocitos T CD8+/mm² es mayor en el estroma que en el interior de los nidos neoplásicos. Esta distribución se mantiene independientemente de la categoría TC y en todas las categorías IC a excepción de la IC1, donde el número de linfocitos T CD8+/mm² es mayor en los nidos neoplásicos.

BIBLIOGRAFÍA

Abusamra AJ, Zhong Z, Zheng X, Li M, Ichim TE, Chin JL, Min WP. Tumor exosomes expressing fat ligand mediate CD8+ T-cell apoptosis. *Blood Cell Mol Dis* 2005;35:169-173.

Aerts JG, Hegmans JP. Tumor-specific cytotoxic T cells are crucial for efficacy of immunomodulatory antibodies in patients with lung cancer. *Cancer Res* 2013;73(8):1381-2388.

Akbay EA, Koyama S, Carretero J, Altabef A, Tchaicha JH, Christensen CL et al. Activation of the PD-1 pathway contributes to immune escape in EGFR-driven tumors. *Cancer Discov* 2013;3:1355-1363.

Albina JE, Mills CD, Henry WL Jr, Caldwell MD. Temporal expression of different pathways of l-arginine metabolism in healing wounds. *J Immunol* 1990;144:3877-3880.

Allen TC. Food and Drug Administration approval of laboratory tests. *Arch Pathol Lab Med* 2013;137(1):13-18.

Allen TC. US Food and Drug Administration-approved laboratory tests after Caronia. *Arch Pathol Lab Med* 2013;137(11):1543-1544.

Allen TC. Loss of chance doctrine-an emerging theory of medical malpractice liability. *Pathol Case Rev* 2012;17(4):172-174.

Allred DC, Harvey JM, Berardo M et al. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 1998;11(2):155-168.

Almand B, Clark JI, Nikitina E, van Beynen J, English NR, Knight SC, Carbone DP, Gabrilovich DI. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol* 2001;166:678-689.

Ananiev J, Guluvoba MV, Manolova IM. Prognostic significance of CD83 positive tumor-infiltrating dendritic cells and expression of TGF-beta 1 in human gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2011;58:1834-1840.

Antonia SJ, López-Martin JA, Bendell J, Ott PA, Taylor M, Eder JP, Jäger D, Pietanza MC, Le DT, de Braud F, Morse MA, Ascierto PA, Horn L, Amin A, Pillai RN, Evans J, Chau I, Bono P, Atmaca A, Sharma P, Harbison CT, Lin CS, Christensen O, Calvo E. Nivolumab alone and nivolumab plus ipilimumab in recurrent small-cell lung cancer (CheckMate 032): a multicentre, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet Oncol.* 2016 Jul;17(7):883-95.

Apetoh L, Vegran F, Ladoire S, Ghiringhelli F. Restoration of anti-tumor immunity through selective inhibition of myeloid derived suppressor cells by anticancer therapies. *Curr Mol Med* 2011;11:365-372.

Balsara BR, Testa JR. Chromosomal imbalances in human lung cancer. *Oncogene* 2002; 21:6877-6883. Review.

Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ, Ahmed R. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 2006;439(7077):682-687.

Beatty GL, Chiorean EG, Fishman MP, Saboury B, Teitelbaum UR, Sun W, Huhn RD, Song W, Li D, Sharp LL, Torigian DA, O'Dwyer PJ, Vonderheide RH. CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans. *Science* 2011;331:1612-1616.

Berger R, Rotem-Yehudar R, Slama G, Landes S, Kneller A, Leiba M et al. Phase I safety and pharmacokinetic study of CT-011, a humanized antibody interacting with PD-1 in patients with advanced hematologic malignancies. *Clin Cancer Res* 2008;14:3044-3051.

Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, Chow LQ, Vokes EE, Felip E, Holgado E, Barlesi F, Kohlhäufl M, Arrieta O, Burgio MA, Fayette J, Lena H, Poddubskaya E, Gerber DE, Gettinger SN, Rudin CM, Rizvi N, Crinò L, Blumenschein GR Jr, Antonia SJ, Dorange C, Harbison CT, Graf Finckenstein F, Brahmer JR. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2015;373(17):1627-1639.

Borczuk AC, Allen TC. PD-L1 and Lung Cancer: The Era of Precision-ish Medicine? *Arch Pathol Lab Med.* 2016;140(4):351-354.

Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crinò L, Eberhardt WE, Poddubskaya E, Antonia S, Pluzanski A, Vokes EE, Holgado E, Waterhouse D, Ready N, Gainor J, Arén Frontera O, Havel L, Steins M, Garassino MC, Aerts JG, Domine M, Paz-Ares L, Reck M, Baudelet C, Harbison CT, Lestini B, Spigel DR. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2015;373(2):123-35.

Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 2012;366:2455-2465.

Brahmer JR. Harnessing the immune system for the treatment of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2013;31(8):1021-1028.

Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, Powderly JD, Picus J, Sharfman WH et al. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol* 2010;28:3167-3175.

Brimnes MK, Svane IM, Johnsen HE. Impaired functionality and phenotypic profile of dendritic cells from patients with multiple myeloma. *Clin Exp Immunol* 2006;144:76-84.

Byrne WL, Mills KH, Lederer JA, O'Sullivan GC. Targeting regulatory T cells in cancer. *Cancer Res* 2011;71:6915-6920.

Cagle PT, Allen TC, Dacic S, Beasley MB, Borczuk AC, Chirieac LR, Laucirica R, Ro JY, Kerr KM. Revolution in lung cancer: new challenges for the surgical pathologist. *Arch Pathol Lab Med* 2011;135(1):110-116.

Cagle PT, Stein K, Oomen J, Shemon M, Kyle W. Cancer biomarker testing in the everyday practice of pathology. *Arch Pathol Lab Med* 2015;139(15):583-584.

Chaturvedi V, Collison LW, Guy CS, Workman CJ, Vignali DA. Cutting edge: human regulatory T cells require IL-35 to mediate suppression and infectious tolerance. *J Immunol* 2011;186:6661-6666.

Chen YB, Mu CY, Huang JA. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 expression in patients with non-small cell lung cancer: a 5-year-follow-up study. *Tumori* 2012;98:751-755.

Chinnasamy N, Wargo JA, Yu Z, Rao M, Frankel TL, Riley JP, Hong JJ, Parkhurst MR, Feldman SA, Schrumpp DS, Restifo NP, Robbins PF, Rosenberg SA, Morgan RA. A TCR targeting the HLA-A*0201-restricted epitope of Mage-a3 recognizes multiple epitopes of the Mage-a antigen superfamily in several types of cancer. *J Immunol* 2011;186:685-696.

Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* 2013 Jul;39(1):1-10. Review.

Cheng P, Corzo CA, Luetteke N, Yu B, Nagaraj S, Bui MM, Ortiz M, Nacken W, Sorg C, Vogl T, Roth J, Gabrilovich DI. Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100a9 protein. *J Exp Med* 2008;205:2235-2249.

Clamon G, Herndon J, Kern J, Govindan R, Garst J, Watson D et al. Lack of trastuzumab activity in nonsmall cell lung carcinoma with overexpression of erb-B2: 39810: a phase II trial of Cancer and Leukemia Group B. *Cancer* 2005;103:1670-1675.

Cogswell JP, Goldberg SM, Gupta AK, Jure-Kunkel M, Wang XT, Wigginton JM. Cancer immunotherapy by disrupting pd-1/pdl1 signaling. Google Patents 2013: WO2013173223 A1.

Cornelissen R, Heuvers ME, Maat AP, Hendriks RW, Hoogsteden HC, Aerts JG, Hegmans JP. New roads open up for implementing immunotherapy in mesothelioma. Clin Dev Immunol 2012;2012:927240.

Couzin-Frankel J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. Science 2013;342(6165):1432-1433.

Crane CA, Panner A, Murray JC, Wilson SP, Xu H, Chen L, Simko JP, Waldman FM, Pieper RO, Parsa AT. PI3 kinase is associated with a mechanism of immunoresistance in breast and prostate cancer. Oncogene 2009;28:306-312.

Curiel TJ, Wei S, Dong H, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Krzysiek R, Knutson KL, Daniel B, Zimmermann MC, David O, Burow M, Gordon A, Dhurandhar N, Myers L, Berggren R, Hemminki A, Alvarez RD, Emilie D, Curiel DT, Chen L, Zou W. Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. Nat Med 2003;9:562-567.

Dimitrakopoulos FI, Papadaki H, Antonacopoulou AG, Kottorou A, Gotsis AD, Scopa C, Kalofonos HP, Mouzaki A. Association of Foxp3 expression with non-small cell lung cancer. Anticancer Res 2011;31:1677-1683.

D'Incecco A, Andreozzi M, Ludovini V, Rossi E, Capodanno A, Landi L, Tibaldi C, Minuti G, Salvini J, Coppi E, Chella A, Fontanini G, Filice ME, Tornillo L, Incensati RM, Sani S, Crinò L, Terracciano L, Cappuzzo F. PD-1 and PD-L1 expression in molecularly selected non-small-cell lung cancer patients. Br J Cancer 2015;112:95-102.

Dong R, Cwynarski K, Etwistle A, Marelli-Berg F, Dazzi F, Simpson E, Goldman JM, Melo JV, Lechler RI, Bellantuono I, Ridley A, Lombardi G. Dendritic cells from CML patients have altered actin organization, reduced antigen processing and impaired migration. Blood 2003;101:3560-3567.

Dolled-Filhart M, Roach C, Toland G, Stanforth D, Jansson M, Lubiniecki GM, Ponto G, Emancipator K. Development of a PD-L1 immunohistochemistry assay for use as a companion Diagnostic for Pembrolizumab (MK-3475) in Non-Small Cell Lung Cancer. J Clin Oncol 2015;33(15):11065.

Domingues D, Turner A, Silva MD, Marques DS, Mellidez JC, Wanneson L et al. Immunotherapy and lung cancer: current developments and novel targeted therapies. Immunotherapy 2014;6:1221-1235.

Dong H, Strome SE, Salomao DR Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, Roche PC, Lu J, Zhu G, Tamada K, Lennon VA, Celis E, Chen L. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002;8:793-800.

Drake CG, Lipson EJ, Brahmer JR. Breathing new life into immunotherapy: review of melanoma, lung and kidney cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2014;11:24-37.

Droeser RA, Hirt C, Viehl CT, Frey DM, Nebiker C, Huber X, Zlobec I, Eppenberger-Castori S, Tzankov A, Rosso R, Zuber M, Muraro MG, Amicarella F, Cremonesi E, Heberer M, Iezzi G, Lugli A, Terracciano L, Sconocchia G, Oertli D, Spagnoli GC, Tornillo L. Clinical impact of programmed cell death ligand 1 expression in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2013;49:2233-2242.

Ettinger DS. Overview and state of the art in management of lung cancer. *Oncology* 2004;18:3-9.

Evans JT, Shows TB, Sproul EE, Paolini NS, Mittelman A, Haushka TS. Genetics of colon carcinogenesis in mice treated with 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Res* 1977;37:134-136.

Finke J, Ko J, Rini B, Rayman P, Ireland J, Cohen P. MDSC as a mechanism of tumor escape from sunitinib mediated anti-angiogenic therapy. *Int Immunopharmacol* 2011;11:856-61.

Finn OJ. Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Ann Oncol* 2012;23 Suppl 8:viii6-9. Review.

Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-L1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev* 2010;236:219-242.

Fury M, Ou SH, Balmanoukian A, Hansen A, Massarelli E, Blake-Haskins A et al. Clinical Activity and Safety of MEDI4736, an Anti-PD-L1 Antibody, in Patients with Head and Neck Cancer. *Ann Oncol* 2014;25:iv340-iv356.

Gadiot J, Hooijkaas AI, Kaiser AD, van Tinteren H, van Boven H, Blank C. Overall survival and PD-L1 expression in metastasized malignant melanoma. *Cancer* 2011;117:2192-2201.

Galon J, Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Berger A, Lagorce C, Lugli A, Zlobec I, Hartmann A, Bifulco C, Nagtegaal ID, Palmqvist R, Masucci GV, Botti G, Tatangelo F, Delrio P, Maio M, Laghi L, Grizzi F, Asslaber M, D'Arrigo C, Vidal-Vanaclocha F, Zavadova E, Chouchane L, Ohashi PS, Hafezi-Bakhtiari S, Wouters BG, Roehrl M, Nguyen L, Kawakami Y, Hazama S, Okuno K, Ogino S,

Gibbs P, Waring P, Sato N, Torigoe T, Itoh K, Patel PS, Shukla SN, Wang Y, Kopetz S, Sinicrope FA, Scripcariu V, Ascierto PA, Marincola FM, Fox BA, Pagès F. Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *J Pathol* 2014;232(2):199-209.

Gao Q, Wang XY, Qiu SJ, Yamato I, Sho M, Nakajima Y, Zhou J, Li BZ, Shi YH, Xiao YS, Xu Y, Fan J. Overexpression of PD-L1 significantly associates with tumor aggressiveness and postoperative recurrence in human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2009;15:971-979.

Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leighl N, Balmanoukian AS, Eder JP, Patnaik A, Aggarwal C, Gubens M, Horn L, Carcereny E, Ahn MJ, Felip E, Lee JS, Hellmann MD, Hamid O, Goldman JW, Soria JC, Dolled-Filhart M, Rutledge RZ, Zhang J, Lunceford JK, Rangwala R, Lubiniecki GM, Roach C, Emancipator K, Gandhi L; KEYNOTE-001 Investigators. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015;372(21):2018-2028.

Gettinger SN, Kowanetz M, Koeppen H et al. Molecular, immune and histopathological characterization of NSCLC based on PD-L1 expression on tumor and immune cells and association with response to anti-PD-L1 antibody MPDL3280A (abstract). *J Clin Oncol* 2015; 33(15) (suppl): 3015

Grosso J, Horak CE, Inzunza D, Cardona DM, Simon JS, Gupta AK et al. Association of tumor PD-L1 expression and immune biomarkers with clinical activity in patients with advanced solid tumors treated with novolumab (anti-PD-1; BMS-936558;ONO-4538). *J Clin Oncol* 2013;31:3016 (abstract)

Guinee DG Jr, Fishback NF, Koss MN, Abbondanzo SL, Travis WD. The spectrum of immunohistochemical staining of small-cell lung carcinoma in specimens from transbronchial and open-lung biopsies. *Am J Clin Pathol* 1994 ;102(4):406-414.

Gulubova MV, Ananiev JR, Vlaykova TI, Yovchev Y, Tsoneva V, Manolova IM. Role of dendritic cells in progression and clinical outcome of colon cancer. *Int J Colorectal Dis* 2012;27:159-169.

Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K et al. Programmed cell death ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:3360-3365.

Hawrylowicz CM, O'Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* 2005;5:271-283.

Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, Sosman JA, McDermott DF, Powderly JD, Gettinger SN, Kohrt HE, Horn L, Lawrence

DP, Rost S, Leabman M, Xiao Y, Mokatrini A, Koeppen H, Hegde PS, Mellman I, Chen DS, Hodi FS. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 2014 Nov;515(7528):563-567.

Hibbs JB, Vavrin Z, Taintor RR. L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J Immunol* 1987;138:550-565.

Higgs BW, Robbins PB, Blake-Haskins JA et al. High tumoral IFN γ mRNA, PD-L1 protein, and combined IFN γ mRNA/PD-L1 protein expression associates with response to durvalumab (anti-PD-L1) monotherapy therapy in NSCLC patients. *Eur J Cancer* 2015; 51 (suppl 3); S717, 15LBA.

Hino R, Kabashima K, Kato Y, Yagi H, Nakamura M, Honjo T, Okazaki T, Tokura Y. Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer* 2010;116:1757-1766.

Hoechst B, Ormandi LA, Ballmaier M, Lehner F, Kruger C, Manns MP, Greten TF, Korangy F. A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+)CD25(+)foxp3(+) T cells. *Gastroenterology* 2008;135:234-243.

Ilie M, Long-Mira E, Bence C, Butori C, Lassalle S, Bouhlef L, Fazzalari L, Zahaf K, Lalvée S, Washetine K, Mouroux J, Vénissac N, Poudenx M, Otto J, Sabourin JC, Marquette CH, Hofman V, Hofman P. Comparative study of the PD-L1 status between surgically resected specimens and matched biopsies of NSCLC patients reveal major discordances: a potential issue for anti-PD-L1 therapeutic strategies. *Ann Oncol* 2016;27:147-153.

Intlekofer AM, Thompson CB. At the bench: preclinical rationale for CTLA-4 and PD-1 blockade as cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol* 2013;94(1):25-39.

Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*. 1992;11(11):3887-3895.

Ishii H, Azuma K, Kawahara A, Yamada K, Imamura Y, Tokito T, Kinoshita T, Kage M and Hoshino T. Significance of programmed cell death-ligand 1 expression and its association with survival in patients with small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2015 Mar;10(3):426-30

Jansen RL, Slingerland R, Goey SH, Franks CR, Bolhuis RL, Stoter G. Interleukin-2 and interferon-alpha in the treatment of patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Immunother* 1992;12:70-73.

Jia J, Wang Z, Li X, Wang X. Morphological characteristics and co-stimulatory molecule (CD80, CD86, CD40) expression in tumor infiltrating dendritic cells in human endometrioid adenocarcinoma. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2012;160:223-227.

Jiang X, Zhou J, Giobbie-Hurder A, Wargo J, Hodi FS. The activation of MAPK in melanoma cells resistant to BRAF inhibition promotes PD-L1 expression that is reversible by MEK and PI3K inhibition. *Clin Cancer Res* 2013; 19:598-609.

Ji M, Liu Y, Li Q, Li XD, Zhao WQ, Zhang H, Zhang X, Jiang JT, Wu CP. PD-1/PD-L1 pathway in non-small-cell lung cancer and its relation with EGFR mutations. *J Transl Med* 2015;13:5.

Jilaveanu LB, Shuch B, Zito CR. PD-L1 expression in clear renal cell carcinoma: an analysis of nephrectomy and sites of metastases. *J Cancer* 2014;5:166-172.

Karachaliou N, Mayo-de-Las-Casas C, Molin-Vila MA, Rosell R. Real-time liquid biopsies become a reality in cancer treatment. *Ann Transl Med* 2015;3:36.

Kashimura S, Saze Z, Terashima M, Soeta N, Ohtani S, Osuka F, Kogure M, Gotoh M. CD38(+) dendritic cells and Foxp3(+) regulatory cells in primary lesions and regional lymph nodes are inversely correlated with prognosis in gastric cancer. *Gastric Cancer* 2012;15:144-153.

Kaye FJ. RB and cyclin dependent kinase pathways: defining a distinction between RB and p16 loss in lung cancer. *Oncogene* 2002; 21(45):6908-6914. Review.

Kaufmann O, Dietel M. Expression of thyroid transcription factor-1 in pulmonary and extrapulmonary small cell carcinomas and other neuroendocrine carcinomas of various primary sites. *Histopathology* 2000; 36:415-420.

Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2008;26:677-704.

Kerr KM, Hirsch FR. Programmed Death Ligand-1 Immunohistochemistry: Friend or Foe? *Arch Pathol Lab Med* 2015;140(4):326-331.

Kerr KM, Tsao MS, Nicholson AG, Yatabe Y, Wistuba II, Hirsch FR; IASLC

Pathology Committee. Programmed Death-Ligand 1 Immunohistochemistry in Lung Cancer: In what state is this art? *J Thorac Oncol* 2015;10(7):985-989.

Kitazono S, Fujiwara Y, Tsuta K, Utsumi H, Kanda S, Horinouchi H, Nokihara H, Yamamoto N, Sasada S, Watanabe S, Asamura H, Tamura T, Ohe Y. Reliability of small biopsy samples compared with resected specimens for the determination of programmed death-ligand 1 expression in non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2015;16: 385-390.

Konishi J, Yamazaki K, Azuma M, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Nishimura M. B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. *Clin Cancer Res* 2004;10:5094-5100.

Krawczyk P, Wojas K, Milanowski P, Rolinski J. Myeloid and lymphoid dendritic cells and cytotoxic T lymphocytes in peripheral blood of non-small cell lung cancer patient-a pilot study. *Adv Med Sci* 2006;51:160-163.

Langer CJ. Emerging immunotherapies in the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC): the role of immune checkpoint inhibitors. *Eur J Cancer* 2014;50(7):1361-1369.

Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long AJ, Brown JA, Nunes R, Greenfield EA, Bourque K, Boussiotis VA, Carter LL, Carreno BM, Malenkovich N, Nishimura H, Okazaki T, Honjo T, Sharpe AH, Freeman GJ. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2001;2(3):261-268.

Lee JM, Seo JH, Kim YJ, Kim YS, Ko HJ, Kang CY. The restoration of myeloid-derived suppressor cells as functional antigen-presenting cells by NKT cell help and all-trans-retinoic acid treatment. *Int J Cancer* 2011;131:741-751.

Li H, Zhao H, Yu J, Su Y, Cao S, An X, Ren X. Increased prevalence of regulatory T cells in the lung cancer microenvironment: a role of thymic stromal lymphopoietin. *Cancer Immunol Immunother* 2011;60:1587-1596.

Lipson EJ, Sharfman WH, Drake CG et al. Durable cancer regression off-treatment and effective reinduction therapy with an anti-PD-1 antibody. *Clin Cancer Res* 2013;19(2):462-468.

Lipson EJ, Vincent JG, Loyo M, Kagohara LT, Lubner BS, Wang H, Xu H, Nayar SK, Wang TS, Sidransky D, Anders RA, Topalian SL, Taube JM. PD-L1 expression in the Merkel cell carcinoma microenvironment: association with inflammation, Merkel cell polyomavirus, and overall survival. *Cancer Immunol Res* 2013;1:54-63.

Liu J, Hamrouni A, Wolowiec D, Coiteux V, Kuliczkowski K, Hetuin D et al. Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN-gamma and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood* 2007;110:296-304.

Liu CY, Wang YM, Wang CL, Feng PH, Ko HW, Liu YH, Wu YC, Chu Y, Chung FT, Kuo

CH, Lee KY, Lin SM, Lin HC, Wang CH, Yu CT, Kuo HP. Population alterations of l-arginase- and inducible nitric oxide synthase-expressed CD11b+/CD14-/CD15+/CD33+ myeloid-derived suppressor cells and CD8+ T lymphocytes in patients with advanced-stage non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010;136:35-45.

Lu T, Ramakrishnan R, Altiok S, Youn JI, Cheng P, Celis E, Pisarev V, Sherman

S, Sporn MB, Gabrilovich D. Tumor-infiltrating myeloid cells induce tumor resistance to cytotoxic T cells in mice. *J Clin Investigation* 2011;121:4015-4029.

Mackaness GB. The Immunological basis of acquired cellular resistance. *J Exp Med* 1964;120:105-120.

Madan RA, Gulley JL. Therapeutic cancer vaccine fulfills the promise of immunotherapy in prostate cancer. *Immunotherapy* 2011;3:27-31.

Madore J, Vilain RE, Menzies AM, Kakavand H, Wilmott JS, Hyman J, Yearley JH, Kefford RF, Thompson JF, Long GV, Hersey P, Scolyer RA.

PD-L1 expression in melanoma shows marked heterogeneity within and between patients: implications for anti-PD-1/PD-L1 clinical trials. *Pigment Cell Melanoma Res* 2015;28:245-253.

Marzec M, Zhang Q, Goradia A, Raghunath PN, Liu X, Paessler M et al. Oncogenic kinase NPM/ALK induces through STAT3 expression of immunosuppressive protein CD274 (PD-L1, B7-H1). *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:20852-20857.

Massarelli E, Papadimitrakopoulou V, Welsh J, Tang C, Tsao A. Immunotherapy in lung cancer. *Transl Lung Cancer Res* 2014;3:53-63.

Matthay RA, Mahler DA, Beck GJ, Loke J, Baue AE, Carter DC et al. Intratumoral Bacillus Calmette-Guérin immunotherapy prior to surgery for carcinoma of the lung: results of a prospective randomized trial. *Cancer Res* 1986; 46:5963-5968.

McLaughlin J, Han G, Schalper KA, Carvajal-Hausdorf D, Pelekanou V, Rehman J, Velcheti V, Herbst R, LoRusso P, Rimm DL. Quantitative

Assessment of the Heterogeneity of PD-L1 Expression in Non-Small-Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol* 2016; 2(1):46-54.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394-397.

Metro G, Duranti S, Fisher MJ et al. Emerging drugs for small cell lung cancer-an update. *Expert Opin Emerg Drugs* 2012;17(1):31-36.

Mills CD, Shearer J, Evans R, Cladwell MD. Macrophage arginine metabolism and the inhibition or stimulation of cancer. *J Immunol* 1992;149:2709-2714.

Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman J, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 2000;164:6166-6173.

Mills CD. Macrophage arginine metabolism to ornithine/urea or nitric oxide/citrulline: a life or death issue. *Crit Rev Immunol* 2001;21:399-425.

Mills CD. M1 and M2 Macrophages: oracles of health and disease. *Crit Rev Immunol* 2012;32:463-488.

Mills CD, Ley K. M1 and M2 Macrophages: the chicken and the egg of immunity. *J Innate Immun* 2014;6:716-726.

Mills CD. Anatomy of a discovery: M1 and M2 macrophages. *Front Immunol* 2015;6:212.

Mills CD, Lenz LL and Harris RA. A Breakthrough: Macrophage-Directed Cancer Immunotherapy. *Cancer Res* 2016; 76(3) DOI: 10.1158/0008-5472.

Mu CY, Huang JA, Chen Y, Chen C, Zhang XG. High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cell maturation. *Med Oncol* 2001; 28:682-688.

Mullard A. New checkpoints inhibitors ride the immunotherapy tsunami. *Nat Rev Drug Discov* 2013;12:489-492.

Milne CP, Bryan C, Garafalo S, McKiernan M. Complementary versus companion diagnostics: apples and oranges? *Biomark Med* 2015; 9(1):25-34. Review.

Mouglakakos D, Choudhury A, Lladser A, Klessling R, Johansson CC. Regulatory T cells in cancer. *Adv Cancer Res* 2011;107:57-117.

National Comprehensive Cancer Network. NCCN collaborates with Bristol-Myers Squibb to study PD-L1 expression and test interpretation in lung cancer. Published 2015

Nicholson SA, Beasley MB, Brambilla E, Hasleton PS, Colby TV, Sheppard MN, Falk R, Travis WD. Small cell lung carcinoma (SCLC): a clinicopathologic study of 100 cases with surgical specimens. *Am J Surg Pathol* 2002; 26(9):1184-1197.

Nomi T, Sho M, Akahori T, Hamada K, Kubo A, Kanehiro H et al. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed cell death-1 pathway in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:2151-2157.

Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* 2014;41:49-61.

Ock CY, Keam B, Kim S, Lee JS, Kim M, Kim TM, Jeon YK, Kim DW, Chung DH, Heo DS. Pan-Cancer immunogenic perspective on the tumor microenvironment based on PD-L1 and CD8 T cell infiltration. *Clin Cancer Res* 2016; 22(9):2261-2270.

Ogino S, Galon J, Fuchs CS, Dranoff G. Cancer immunology-analysis of host and tumor factors for personalized medicine. *Nat Rev Clin Oncol* 2001;8:711-719.

Ohigashi Y, Sho M, Yamada Y, Tsurui Y, Hamada K, Ikeda N, Mizuno T, Yoriki R, Kashizuka H, Yane K, Tsushima F, Otsuki N, Yagita H, Azuma M, Nakajima Y. Clinical significance of programmed cell death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11:2947-2953.

Okita R, Saeki T, Takashima S, Yamaguchi Y, Toge T. CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with breast cancer and non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2005;14:1269-1273.

Osterlind K, Andersen PK. Prognostic factors in small cell lung cancer: multivariate model based on 778 patients treated with chemotherapy with or without irradiation. *Cancer Res* 1986; 46(8):4189-4194.

Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells: more mechanisms for inhibiting antitumor immunity. *Cancer Immunol Immunother* 2010;59:1593-1600.

Ostrand-Rosenberg S, Sinha P, Beury DW, Clements VK. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells (mdsc), macrophages, and dendritic cells enhances tumor-induced immune suppression. *Semin Cancer Biol* 2012;22:275-281.

O'Sullivan T, Saddawi-Konefka R, Vermi W, Koebel CM, Arthur C, White JM, Uppaluri R, Andrews DM, Ngiew SF, Teng MW, Smyth MJ, Schreiber RD, Bui JD. Cancer immunoediting by the innate immune system in the absence of adaptative immunity. *J Exp Med* 2012;209:1869-1882.

Pailler E, Adam J, Barthélémy A, Oulhen M, Auger N, Valent A et al. Detection of circulating tumor cells harboring a unique ALK rearrangement in ALK-positive non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2013;31:2273-2281.

Pan PY, Ma G, Weber KJ, Ozao-Choy J, Wang G, Yin B. Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Cancer Res* 2010;70:99-108.

Pan ZK, Ye F, Wu X, An HX, Wu JX. Clinicopathological and prognostic significance of programmed cell death ligand (PD-L1) expression in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *J Thorac Dis* 2015;7:462-470.

Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012;12(4):252-264.

Parsa AT, Waldron JS, Panner A, Crane CA, Parney IF, Barry JJ et al. Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nat Med* 2007;13:84-88.

Pedoeem A, Azoulay-Alfaguter I, Strazza M et al. Programmed death-1 pathway in cancer and autoimmunity. *Clin Immunol* 2014;153(1):145-152.

Petersen I, Hidalgo A, Petersen S, Schlüns K, Schewe C, Pacyna-Gengelbach M, Goeze A, Krebber B, Knösel T, Kaufmann O, Szymas J, von Deimling A. Chromosomal imbalances in brain metastases of solid tumors. *Brain Pathol* 2000;10(3):395-401.

Phillips T, Simmons P, Inzunza HD, Cogswell J, Novotny J Jr, Taylor C, Zhang X. Development of an automated PD-L1 immunohistochemistry (IHC) assay for non-small cell lung cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2015;23(8):541-549.

Pierce RH, Bourne P, Liang L, Bigler M. Antibodies that bind to human programmed death cell ligand (PD-L1). Google patents 2014:WO 2014100079 A1.

Pinzón-Charry A, Ho CS, Maxwell T, McGuckin MA, Schmidt C, Furnival C, Pyke CM, López JA. Numerical and functional defects of blood dendritic cells in early- and late-stage breast cancer. *Br J Cancer* 2007;97:1251-1259.

Powles T, Eder JP, Fine GD, Braiteh FS, Loriot Y, Cruz C et al. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature* 2014;515:558-562.

Qin X, Liu C, Zhou Y, Wang G. Cisplatin induces programmed death-1-ligand (PD-L1) over-expression in hepatoma H22 cells via Erk/MAPK signaling pathway. *Cell Mol Biol* 2010;56 (suppl): OL1366-OL1372.

Ray T. In approving Opdivo with Dako's complementary test, FDA advances Rx personalization option. October 2015.

Rebelatto MC, Mistry A, Sabalos C et al. Development of a PD-L1 companion diagnostic assay for treatment with MEDI4736 in NSCLC and SCCHN patients (abstract). *J Clin Oncol* 2015; 33(suppl):8033

Reiss KA, Forde PM, Brahmer JR. Harnessing the power of the immune system via blockade of PD-1 and PD-L1: a promising new anticancer strategy. *Immunotherapy* 2014;6(4):459-475.

Robert J. Comparative study of tumorigenesis and tumor immunity in invertebrates and nonmammalian vertebrates. *Dev Comp Immunol* 2010;34:915-925.

Rosille D, Gressier M, Damotte D, Maucourt-Boulch D, Pangault C, Semana G et al. High level of soluble programmed cell death ligand 1 in blood impacts overall survival in aggressive diffuse large B-Cell lymphoma: results from a French multicenter clinical trial. *Leukemia* 2014;28:2367-2375.

Ruffell B, Coussens LM. Macrophages and therapeutic resistance in cancer. *Cancer Cell* 2015;13:462-472.

Scagliotti GV, Parikh P, von Pawel J, Biesma B, Vanteesnskiste J, Manegold C et al. Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naïve patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:3543-3551.

Schalper KA, Velcheti V, Carvajal D, Wimberly H, Brown J, Pusztai L, Rimm DL. In situ tumor PD-L1 mRNA expression is associated with increased TILs and better outcome in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2014; 20:2773-2782.

Schiller JH, Morgan-Ihrig C, Levitt ML. Concomitant administration of interleukin-2 plus tumor necrosis factor in advanced non-small cell lung cancer. *Am J Clin Oncol* 1995;18:47-51.

Schneider T, Hoffmann H, Dienemann H, Schnabel A, Enk AH, Ring S, Mahnke K. Non-small cell lung cancer induces an immunosuppressive phenotype of dendritic cells in tumor microenvironment by upregulating b7-h3. *J Thorac Oncol* 2011;6:1162-1168.

Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 2011;331(6024):1565-1570.

Schultheis AM, Scheel AH, Ozretić L, George J, Thomas RK, Hagemann T, Zander T, Wolf J, Buettner R. PD-L1 expression in small cell neuroendocrine carcinomas. *Eur J Cancer* 2015;51:421-426.

Sharma S, Yang SC, Zhu L, Reckamp K, Gardner B, Baratelli F, Huang M, Batra RK, Dubinett SM. Tumor cyclooxygenase-2/prostaglandin e2-dependent promotion of Foxp3 expression and CD4+CD25+ T regulatory cell activities in lung cancer. *Cancer Res* 2005;65:5211-5220.

Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol* 2007;8:239-245.

Shepherd FA. Screening, diagnosis, and staging of lung cancer. *Curr Opin Oncol* 1993;5(2):310-322. Review.

Sholl LM, Aisner DL, Allen TC, Beasley MB, Borczuk AC, Cagle PT, Capelozzi V, Dacic S, Hariri L, Kerr KM, Lantuejoul S, Mino-Kenudson M, Raparia K, Rekhtman N, Roy-Chowdhuri S, Thunnissen E, Tsao MS, Yatabe Y; Members of Pulmonary Pathology Society. Programmed Death Ligand-1 Immunohistochemistry--A New Challenge for Pathologists: A Perspective From Members of the Pulmonary Pathology Society. *Arch Pathol Lab Med* 2016 ;140(4):341-344.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics 2015. *CA Cancer J Clin* 2015;65:5-29.

Siegelin MD, Borczuk AC. Epidermal growth factor receptor mutations in lung adenocarcinoma. *Lab Invest* 2014;94(2):129-137.

Solomon BJ, Mok T, Kim DW et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2014;371(23):2167-2177.

Spira AI, Park K, Mazières J et al. Efficacy, safety and predictive biomarker results from a randomized phase II study comparing MPDL323280A vs docetaxel in 2L/3L NSCLC (POPLAR). *J Clin Oncol* 2015;33(15): 8010 (abstract).

Stewart R, Morrow M, Hammond SA. Identification and characterization of MEDI4736, an antagonistic anti-PD-L1 monoclonal antibody. *Cancer Immunol Res* 2015;3(9):1052-1062.

Sun Y, Wang Y, Zhao J, Gu M, Giscombe R, Lefvert AK, Wang X. B7-H3 and B7-H4 expression in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 2006;53(2):143-151.

Sun Z, Shi L, Zhang H, Shao Y, Wang Y, Lin Y, Li X, Bai C. Immune modulation and safety profile of adoptive immunotherapy using expanded autologous activated lymphocytes against advanced cancer. *Clin Immunol* 2011;138:23-32.

Sundar R, Soong R, Cho BC, Brahmenr JR, Soo Ra. Immunotherapy in the treatment of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2014; 85:101-109.

Suzuki K, Kachala SS, Kadota K, Shen R, Mo Q, Beer DG, Rusch VW, Travis WD, Adusumilli PS. Prognostic immune markers in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17:5247-5256.

Tao H, Mimura Y, Aoe K, Kobayashi S, Yamamoto H, Matsuda E, Okabe K, Matsumoto T, Sugi K, Ueoka H. Prognostic potential of foxp3 expression in non-small cell lung cancer cells combined with tumor-infiltrating regulatory cells. *Lung Cancer* 2012;75:95-101.

Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL et al. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptative resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med* 2012;4:127-137.

Taube JM, Klein A, Brahmer JR, Xu H, Pan X, Kim JH et al. Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin Cancer Res* 2014;20:5064-5074.

Teixidó C, Karachaliou N, González-Cao M, Morales-Espinosa D, Rosell R. Assay for predicting and monitoring responses to lung cancer immunotherapy. *Cancer Biol Med* 2015;12:87-95.

Teixidó C, Karachaliou N, Peg V, Giménez-Capitan A, Rosell R. Concordance of IHC, FISH and RT-PCR for EML4-ALK rearrangements. *Transl Lung Cancer Res* 2014;3:70-74.

Tey SK, Bollard CM, Heslop HE. Adoptive T-cell transfer in cancer immunotherapy. *Immunol Cell Biol* 2006;84:281-289.

Thierry AR, Mouliere F, El Messaoudi S, Mollevi C, Lopez-Crapez E, Rolet F et al. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat Med* 2014;20:430-435.

Thomas A, Hassan R. Immunotherapies for non-small-cell lung cancer and mesothelioma. *Lancet Oncol* 2012;13:e301-10.

Thompson RH, Gillet MD, Cheville JC, Lohse CM, Dong H, Webster WS, Chen L, Zincke H, Blute ML, Leibovich BC, Kwon ED. Costimulatory molecule B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:17174-17179.

Thompson RH, Gillet MD, Cheville JC, Lohse CM, Dong H, Webster WS, Chen L, Zincke H, Blute ML, Leibovich BC, Kwon ED. Costimulatory molecule B7-H1 in primary and metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Cancer* 2005; 104:2084-2091.

Thompson RH, Kwon ED. Significance of B7-H1 overexpression in kidney cancer. *Clin Genitourin Cancer* 2006; 5: 206-211.

Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 1998;188:287-296.

Thompson RH, Dong H, Kwon ED. Implications of B7-H1 expression in clear cell carcinoma of the kidney for prognostication and therapy. *Clin Cancer Res* 2007;13:709s-715s.

Topalian SL, Sznol M, McDermott DF et al. Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J Clin Oncol* 2014;32(10):1020-1030.

Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, Powderly JD, Carvajal RD, Sosman JA, Atkins MB, Leming PD, Spigel DR, Antonia SJ, Horn L, Drake CG, Pardoll DM, Chen L, Sharfman WH, Anders RA, Taube JM, McMiller TL, Xu H, Korman AJ, Jure-Kunkel M, Agrawal S, McDonald D, Kollia GD, Gupta A, Wigginton JM, Sznol M. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012;366(26):2443-1454.

Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JH, Beasley MB, Chirieac LR, Dacic S, Duhig E, Flieder DB, Geisinger K, Hirsch FR, Ishikawa Y, Kerr KM, Noguchi M, Pelosi G, Powell CA, Tsao MS, Wistuba I; WHO Panel. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol* 2015;10(9):1243-1260.

Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger K, Yatabe Y, Ishikawa Y, Wistuba I, Flieder DB, Franklin W, Gazdar A, Hasleton PS, Henderson DW, Kerr KM, Petersen I, Roggli V, Thunnissen E, Tsao M. Diagnosis of lung cancer in small biopsies and cytology: implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification. *Arch Pathol Lab Med* 2013;137(5):668-684.

Travis WD, Brambilla E, Riely GJ. New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials. *J Clin Oncol* 2013;31:992-1001.

Travis WD. Update on small cell carcinoma and its differentiation from squamous cell carcinoma and other non-small cell carcinomas. *Mod Pathol* 2012;25 (suppl.1):S18-30.

Tsao MS, Kerr KM, Sanja D, Yatabe Y, Hirsh FR (eds). IASLC Atlas of PD-L1 Immunohistochemistry in Lung Cancer. International Association for the Study of Lung Cancer. IASLC-Rx Press 2017. ISBN: 978-0-9832958-7-7.

Tumeh PC, Harview CL, Yeraley JH, Shintaku IP, Taylor EJ, Robert L et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptative immune resistance. *Nature* 2014;515:568-571

Ulloa-Montoya F, Louahed J, Dizier B, Gruselle O, Spiessens B, Lehmann FF, Suci S, Kruit WH, Eggermont AM, Vansteenkiste J, Brichard VG. Predictive gene signature in MAGE-A3 antigen-specific cancer immunotherapy. *J Clin Oncol* 2013;31(19):2388-2395.

US Food and Drug Administration. Public workshop-complexities in personalized medicine; harmonizing companion diagnostics across a class of targeted therapies. March 2015.

US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Devices and Radiological Health, Center for Biologics Evaluation and Research, Center for Drug Evaluation and Research. In vitro companion diagnostic devices: guidance for industry and food and drug administration staff. August 2014.

Velcheti V, Schalper KA, Carvajal DE, Anagnostou VK, Syrigos KN, Sznol M, Herbst RS, Gettinger SN, Chen L, Rimm DL. Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer. *Lab Invest* 2014;94(1):107-116.

Wang A, Wang HY, Liu Y, Zhao MC, Zhang HJ, Lu ZY, Fang YC, Chen XF, Liu GT. The prognostic value of PD-L1 expression for non-small cell lung cancer patients: a meta-analysis. *Eur J Surg Oncol* 2015 ;41(4):450-456.

- Wang J, Cao Z, Zhang XM, Nakamura M, Sun M, Hartman J, Harris RA, Sun Y, Cao Y. Novel mechanism of macrophage-mediated metastasis revealed in a zebrafish model of tumor development. *Cancer Res* 2015;75:306-315.
- Weber JS, Kudchadkar RR, Yu B, Gallenstein D, Horak CE, Inzunza HD et al. Safety, efficacy, and biomarkers of nivolumab with vaccine in ipilimumab-refractory or-naïve melanoma. *J Clin Oncol* 2013;31:4311-4318.
- Wei S, Kryczek I, Zou W. S Regulatory T-cell compartmentalization and trafficking. *Blood* 2006;108:426-431.
- White JR, Harris RA, Lee SR, Craigon MH, Binley K, Price T, Beard GL, Mundy CR, Naylor S. Genetic amplification of the transcriptional response to hypoxia as a novel means of identifying regulators of angiogenesis. *Genomics* 2004;83:1-8.
- Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 2013;369(2):122-133.
- Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, Rubin SC, Kaiser LR, June CH. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* 2001;61:4766-72.
- Wu C, Zhu Y, Jiang J, Zhao J, Zhang XG, Xu N. Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance. *Acta Histochem* 2006;108:19-24.
- Yanagimoto H, Takai S, Satoi S, Toyokawa H, Takahashi K, Terakawa N, Kwon AH, Kamiyama Y. Impaired function of circulating dendritic cells in patients with pancreatic cancer. *Clin Immunol* 2005;114:52-60.
- Yang CY, Lin MW, Chang YL, Wu CT, Yang PC. Programmed cell death-ligand 1 expression in surgically resected stage I pulmonary adenocarcinoma and its correlation with driver mutations and clinical outcomes. *Eur J Cancer* 2014;50(7):1361-1369.
- Yang LL, Wu YL. Recent advances of immunotherapy in lung cancer: anti-programmed cell death-1/programmed death ligand-1 antibodies. *Lung Cancer Management* 2014;3:175-190.
- Yang W, Yu J. Immunologic function of dendritic cells in esophageal cancer. *Dig Dis Sci* 2008;53:1739-1746.

Yearley J, Gibson C, Yu N et al. PD-L2 expression in human tumors: relevance to anti-PD-L1 therapy in cancer. *Eur J Cancer* 2015; 51 (suppl 3); S718, 18LBA.

Youn JI, Gabrilovich DI. The biology of myeloid-derived suppressor cells: more mechanisms for inhibiting antitumor immunity. *Cancer Immunol Immunother* 2010;59:1593-1600.

Yu H, Batenchuk C, Badzio A, Boyle TA, Czapiewski P, Chan DC, Lu X, Gao, D, Elliso K, Kowalewski AA, Rivard RJ, Dziadziuszko R, Zhou C, Hussein M, Richards D, Wilks S, Monte M, Edenfield W, Goldschmidt J, Page R, Brian Ulrich B, Waterhouse D, Close S, Jassem J, Kulig K, Hirsch FR. PD-L1 expression by two complementary diagnostic assays and mRNA in situ hybridization in small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2017;12(1):110-120.

Zeng Z, Xu X, Zhang Y, Xing J, Long J, Gu L, Wang X, Sun D, Ka W, Yao W, Wen Z, Chien S. Tumor-derived factors impaired motility and immune functions of dendritic cells through derangement of biophysical characteristics and reorganization of cytoskeleton. *Cell Motil Cytoskeleton* 2007;64:186-198.

Zou W. Regulatory T cells, tumor immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2006;6:295-307.

Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 2008;8:467-477.